

# **MYCN-DNA-Vakzine zur Behandlung des Neuroblastoms**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Diplom Biologe Alexander Stermann**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. N. Lode

2. Prof. Dr. Lockau

3. PD Dr. Schramm

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2014



<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Neuroblastom .....	1
1.2 MYCN im Neuroblastom .....	2
1.3 Die MYC-Familie .....	4
1.4 Biologische Funktion der MYC-Gene.....	6
1.5 Behandlung des Neuroblastoms und passive Immuntherapie .....	8
1.6 Aktive Immuntherapie.....	9
1.6.1 Zentrale Toleranz .....	9
1.6.2 Periphere Toleranz .....	10
1.7 Tumor-assoziierte Antigene und selbstreaktive T-Zellen .....	12
1.8 Präsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle .....	13
1.9 DNA-Vakzine und Applikationsformen .....	16
1.10 Minigene.....	18
1.11 Das NXS2- und C1300-NB-Mausmodell .....	19
1.12 Zielsetzung.....	19
<b>2. Material .....</b>	<b>21</b>
2.1 Reagenzien .....	21
2.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien .....	21
2.3 Laborgeräte.....	21
2.4 Enzyme.....	22
2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und Lösungen.....	22
2.6 Verwendete Antikörper .....	23
2.7 Antibiotika.....	24
2.8 Plasmide.....	24
2.9 Größenstandards .....	26
2.9.1 DNA-Marker .....	26
2.9.2 Protein-Marker.....	26
2.10 Puffer und Lösungen .....	26
2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen.....	26
2.10.2 Immunfluoreszenz .....	26
2.10.3 Western Blot.....	27
2.11 Bakterienmedien .....	27
2.12 Zellkulturmedien und Zusätze .....	28
2.13 Verwendete Bakterienstämme .....	28
2.14 Verwendete Zelllinien .....	28
<b>3. Methoden.....</b>	<b>29</b>
3.1 Standardmethoden .....	29
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1 Transformation kompetenter JM109- <i>E.coli</i> -Bakterien.....	29
3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	29
3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Tumoren .....	29
3.2.4 Ethanolfällung.....	30

3.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden aus Agarose-Gelen.....	30
3.2.6	Restriktionen .....	30
3.2.7	Transformation von <i>S. typhimurium</i> SL 7207 durch Elektroporation.....	30
3.2.8	Ligationen.....	31
3.2.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.2.10	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) .....	32
<b>3.3</b>	<b>Herstellung der DNA-Vakzine .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Generierung der Minigene.....	34
3.3.2	Das Expressionsplasmid pCMV-F3Ub .....	35
<b>3.4</b>	<b>RNA-Analyse-Techniken .....</b>	<b>36</b>
3.4.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	36
3.4.2	Reverse Transkription .....	36
3.4.3	<i>Real-Time</i> -quantitative-PCR (q-PCR).....	37
<b>3.5</b>	<b>Zellkulturmethoden.....</b>	<b>39</b>
3.5.1	Kultivierung von Zelllinien.....	39
3.5.2	Kryokonservierung von Zelllinien.....	40
3.5.3	Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™ <sub>6</sub> .....	40
3.5.4	Herstellung stabiler Zellklone .....	40
3.5.5	Tetracyclin-induzierbare Vektorsysteme.....	41
3.5.6	Dual-Luciferase®-Reporter-Assay.....	43
3.5.7	Durchflusszytometrie (FACS).....	43
3.5.8	CFSE-Färbung .....	44
<b>3.6</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>45</b>
3.6.1	Extraktion von Proteinen aus Zellen .....	45
3.6.2	SDS-PAGE und Western-Blot .....	45
3.6.3	Immunfluoreszenz .....	46
<b>3.7</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>47</b>
3.7.1	Mäuse.....	47
3.7.2	Orale Impfung von Mäusen .....	47
3.7.3	Subkutane Applikation der Tumorzellen .....	47
3.7.4	Chirurgische Intervention bei Versuchsmäusen .....	48
3.7.5	Beendigung eines Mausexperiments.....	48
<b>3.8</b>	<b>Immunologische Methoden.....</b>	<b>49</b>
3.8.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus lymphatischen Organen .....	49
3.8.2	Messung der Aktivität isolierter Lymphozyten mittels IFN- $\gamma$ -ELISA .....	49
3.8.3	Messung der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten.....	50
3.8.4	Pulsen von SCK-Zellen mit exogenen Peptiden.....	51
<b>3.9</b>	<b>Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten.....</b>	<b>52</b>
3.9.1	Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten.....	52
3.9.2	Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Tumoren .....	52
<b>3.10</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Herstellung der DNA-Vakzine .....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Auswahl der Minigen-Sequenzen .....	54
4.1.2	Herstellung der Minigene mittels überlappender PCR.....	55
4.1.3	Herstellung der MYCN-cDNA Vakzine .....	56
4.1.4	Subklonierung der Vakzin-Sequenzen in den Vektor pCMV-F3Ub .....	56
4.1.5	Nachweis der Expression der Minigen- und cDNA-Vakzinen <i>in vitro</i> .....	58
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung der DNA-Vakzine <i>in vivo</i> .....</b>	<b>59</b>
4.2.1	MYCN-Vakzinierung reduziert das wt-NXS2-Primärtumorstadium in A/J-Mäusen.....	59
4.2.2	MYCN-spezifische T-Lymphozyten vermitteln Anti-Tumor-Antwort .....	62
4.2.3	Analyse der Antigen-spezifität von Lymphozyten geimpfter Mäuse.....	63
<b>4.3</b>	<b>Etablierung stabiler MYCN-überexprimierender C1300- und NXS2-Zelllinien.....</b>	<b>65</b>



4.3.1	Stabile Transfektion des Repressorplasmids .....	65
4.3.2	Analyse der genomischen Integration des Transgens .....	67
4.3.3	Auswahl der neuen Zelllinien .....	68
4.3.4	Expressionskinetik der Transfektanten .....	70
<b>4.4</b>	<b><i>In-vitro</i>-Charakterisierung der Zelllinien .....</b>	<b>71</b>
4.4.1	Zelluläre Veränderungen durch <i>MYCN</i> .....	71
4.4.2	Nachweis der intrazellulären Transgen-Expression mittels Immunfluoreszenz .....	72
4.4.3	Bestimmung der Anzahl integrierter Transgene mittels FISH .....	73
4.4.4	<i>MYCN</i> beschleunigt die Proliferation der Transfektanten .....	74
4.4.5	<i>MYCN</i> -abhängige Expression Zellzyklus-relevanter Gene .....	75
4.4.6	<i>MYCN</i> -induzierte Apoptose-Sensibilisierung .....	78
4.4.7	Einfluss von <i>MYCN</i> auf die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen .....	80
<b>4.5</b>	<b>Etablierung und Charakterisierung der Transfektanten <i>in vivo</i> .....</b>	<b>82</b>
4.5.1	Untersuchung der Tumorigenität von C1300-MYCN-A in A/J-Mäusen .....	82
4.5.2	Untersuchung der Tumorigenität von NXS2-MYCN-1 in A/J-Mäusen .....	85
4.5.3	Passagieren von NXS2-MYCN-1 in A/J-Mäusen .....	87
4.5.4	Expression von H2-K <sup>k</sup> auf NXS2-MYCN-1-nach <i>in-vivo</i> -Passagierung .....	89
<b>4.6</b>	<b>Analyse der Wirksamkeit von <i>MYCN</i>-DNA-Vakzinen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>90</b>
4.6.1	<i>MYCN</i> -DNA-Vakzinierung reduziert das Primärtumorwachstum subkutan injizierter NXS2-MYCN-1-Zellen .....	91
4.6.2	<i>MYCN</i> -DNA-Vakzinierung verzögert die Metastasenbildung durch i.v. injizierte C1300-MYCN-A-Zellen .....	93
<b>4.7</b>	<b>Charakterisierung der Immunantworten <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>95</b>
4.7.1	Antigen-abhängige IFN- $\gamma$ -Sekretion von Splenozyten geimpfter Mäuse .....	95
4.7.2	Spezifische durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Lyse von C1300-MYCN-A .....	97
4.7.3	Tumordinfiltration durch CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen nach Vakzinierung .....	100
4.7.4	Nachweis einer <i>MYCN</i> -spezifischen Zytotoxizität der CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten <i>MYCN</i> -DNA-vakzinierter Mäuse .....	101
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1</b>	<b>Immuntherapien beim Neuroblastom .....</b>	<b>104</b>
5.1.1	<i>MYCN</i> als Ziel einer aktiven Immuntherapie des Neuroblastoms .....	104
5.1.2	Immuntherapien beim immundefizienten Neuroblastom .....	104
<b>5.2</b>	<b><i>MYCN</i>-spezifische DNA-Vakzine .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3</b>	<b><i>In-vivo</i>-Modelle zur Untersuchung immuntherapeutischer Behandlungs-strategien beim NB .....</b>	<b>108</b>
<b>5.4</b>	<b>Etablierung der <i>MYCN</i>-exprimierenden NXS2/C1300-Zelllinien .....</b>	<b>109</b>
<b>5.5</b>	<b>Wirkung der <i>MYCN</i>-DNA-Vakzine <i>in vivo</i> .....</b>	<b>114</b>
5.5.1	<i>MYCN</i> -Vakzine reduzieren primäres Tumorwachstum .....	114
5.5.2	Die Immunantwort wird durch <i>MYCN</i> -spezifische CTL vermittelt .....	115
<b>5.6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>117</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>		<b>119</b>
<b>Summary .....</b>		<b>121</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>123</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>132</b>
<b>Publikationen .....</b>		<b>132</b>
<b>Versicherung an Eides Statt .....</b>		<b>134</b>

## Abkürzungen

A	= Alanin
Abb.	= Abbildung
Abs	= absolut
Ag	= Antigen
Ak	= Antikörper
Amp	= Ampicillin
APC	= Antigenpräsentierende Zelle(n) ( <i>antigen presenting cell(s)</i> )
APS	= Ammoniumpersulfat
AS	= Aminosäure
ATP	= Adenosin-Triphosphat
bp	= Basenpaar(e)
BSA	= Bovines Serum Albumin
C	= Cytosin
cDNA	= „copy“ (komplementäre) DNA
cfu	= <i>colony forming unit</i>
Ci	= Curie, Einheit der Radioaktivität (1 mCi = 37 MBq)
CIP	= Alkalische Phosphatase ( <i>calf intestinal phosphatase</i> )
Cip	= <i>Cdk inhibitory protein</i>
CpG	= Cytosin-phosphatidyl-Guanin
cpm	= <i>counts per minute</i>
CTL	= zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> )
d	= Tag(e)
DAPI	= 4,6-Diamino-2-phenylindol
DEPC	= Diethylpyrocarbonat
dd	= doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
DMSO	= Dimethylsulfoxid
DNA	= Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	= Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	= Doxycyclin
DUB	= Deubiquitinierende Enzyme
<i>E.coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
ECL	= verstärkte Lumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	= <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	= Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	= Ethanol
FACS	= Durchflußzytomtrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FISH	= Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	= Fluoresceinisothiocyanat
FKS	= fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
gDNA	= genomische DNA
GM-CSF	= Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulierungsfaktor
GOI	= <i>gene of interest</i>
Gy	= Grey (Einheit der Röntgenstrahlung)
h	= Stunden ( <i>hours</i> )

HCl	= Salzsäure
HSR	= <i>homogeneously staining regions</i>
IFN	= Interferon
IL	= Interleukin
INK	= <i>Inhibitor of Kinase</i>
INRG	= <i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INSS	= <i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IU	= Internationale Einheiten ( <i>international units</i> )
kDa	= kilo Dalton
LB-Medium	= Luria-Bertani-Medium
M	= Molar (mol pro Liter)
MCS	= <i>multiple cloning side</i>
MIBG	= Metaiodobenzylguanidin
Min	= Minuten
MHC	= Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
mMYCN	= murines <i>MYCN</i>
mRNA	= <i>messenger RNA</i>
MYCN	= <i>V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>
NK-Zellen	= natürliche Killerzellen
nm	= Nanometer
NB	= Neuroblastom
PAGE	= Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC's	= periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral mononuclear blood cells</i> )
PBS	= Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	= Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	= Phycoerythrin
RNA	= Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	= Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	= Raumtemperatur
s	= Sekunde
s.c.	= Subkutan
SDS	= Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	= SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAA	= Tumor-assoziiertes Selbstantigen
Tab.	= Tabelle
TAP	= <i>transporter associated with antigen presentation</i>
TCR	= T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
Tet	= Tetracyclin
TGF- $\beta$	= <i>Transforming Growth Factor -<math>\beta</math></i>
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	= unit
Ub	= Ubiquitin
UV	= Ultraviolett
Vol.	= Volumenanteile
V	= Volt
Wildtyp	= wt
Y	= Tyrosin

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom (NB) ist der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kleinkindalters. Mit einer Inzidenz von 10,2 Fällen pro einer Million Kinder ist es die häufigste diagnostizierte Neoplasie im ersten Lebensjahr. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose beträgt 17 Monate (Maris, 2010). Ausgehend von undifferenzierten, migrierenden, neuroektodermalen Zellen der Neuralleiste, die das periphere sympathische Nervensystem bilden, kann das Neuroblastom in allen extrakraniellen Bereichen lokalisiert sein. Die meisten Primärtumoren (65%) werden im Bereich des Abdomens diagnostiziert, wobei sich über die Hälfte aller NB als Tumoren des Nebennierenmarks erweisen. Häufig treten Primärtumoren auch im Hals-, Brust- und Beckenbereich auf (Maris, 2010).

Zur einheitlichen Risikostratifizierung des jeweiligen Neuroblastoms wurde ein international anerkanntes System geschaffen, das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Tab. 1).

**Tab. 1: *International Neuroblastoma Staging System* (INSS)** (Modak and Cheung, 2010).

Stadium	Ausdehnung
1	lokalisierter, makroskopisch komplett resezierbarer Tumor; repräsentativer ipsilateraler Lymphknoten histologisch tumorfrei (mitresezierte Lymphknoten dürfen Tumor-positiv sein)
2a	lokalisierter, inkomplett resezierbarer Tumor; repräsentative ipsilaterale nicht adhärenzte Lymphknoten histologisch tumorfrei
2b	lokalisierter Tumor; Tumorbefall eines ipsilateralen nicht adhärenzten Lymphknotens, kontralaterale Lymphknoten histologisch tumorfrei
3	nicht-resektabler unilateraler Tumor, der die Wirbelsäule überschreitet, mit oder ohne regionaler Lymphknotenbeteiligung oder lokalisierter unilateraler Tumor mit kontralateraler Lymphknotenbeteiligung oder Mittellinientumor mit bilateraler infiltrativer Ausdehnung oder Lymphknotenbeteiligung
4	disseminierte Tumorerkrankung mit Befall von Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Haut, Leber und/oder anderen Organen
4s	lokalisierter Primärtumor wie in Stadium I oder II beschrieben mit Dissemination begrenzt auf Leber, Haut und Knochenmark (nur Kinder < 12 Monaten; nur geringe Knochenmarksinfiltration (<10% Tumorzellen im Ausstrich, MIBG-Szintigrafie für Knochenmark negativ))

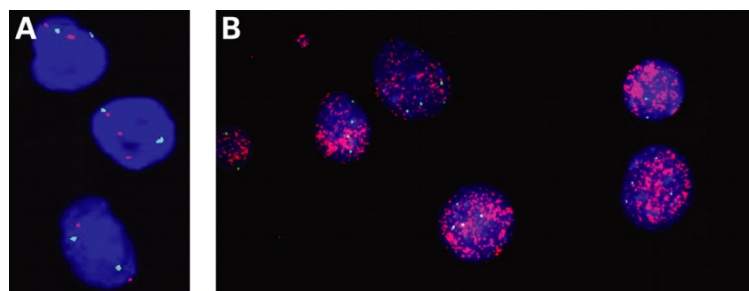
Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 75% (1999-2005) (Moroz *et al.*, 2011), wobei dieser günstige Wert durch die gute Prognose der lokalisierten Stadien 1-3 und durch die häufig spontane Regression von Tumoren im Stadium 4s zurückzuführen ist. Dies wird deutlich, wenn man die Gesamtüberlebensrate mit der von Hochrisikopatienten des Stadiums 4 von nur 35-40% vergleicht (Maris, 2005). Wie eine aktuelle Studie zeigt, ist es

mit Hilfe eines GD<sub>2</sub>-spezifischen Antikörpers in Verbindung mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren gelungen, die 2-Jahres-Überlebensrate bei Hochrisikopatienten auf 66% zu verbessern, (Yu *et al.*, 2010).

Aufgrund der großen Heterogenität des Tumors wurde von der *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) ein neues *Staging System* mit 16 Risiko-Gruppen vorgeschlagen. Bei dem neuen System werden präoperative Risikofaktoren, also biologische Faktoren wie z.B. *MYCN*-Amplifikation, Ploidie, Chromosomen-Aberrationen und weitere mit einbezogen, wodurch die Behandlungsstrategien den Patienten individuell angepasst werden können (Ambros *et al.*, 2009; Cohn *et al.*, 2009). Durch die hohe Heterogenität des Tumors ist der Krankheitsverlauf schwer abschätzbar und sehr divers. Auf der einen Seite gehört das Neuroblastom zu den morbidesten Tumoren des Kleinkindalters, auf der anderen Seite zeigt es den höchsten Anteil an spontaner und kompletter Regression aller humanen Tumoren (Maris, 2010).

## 1.2 *MYCN* im Neuroblastom

*MYCN* ist der bekannteste prognostische Marker des Neuroblastoms (Brodeur *et al.*, 1986). In den 1980er Jahren gelang es zum ersten Mal, eine Amplifikation des auf Chromosom 2p24 lokalisierten *MYCN*-Gens in Neuroblastom-Zelllinien und später auch in Primärtumoren nachzuweisen (Schwab *et al.*, 1983; Brodeur *et al.*, 1984). Mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) können diese zytogenetischen Manifestationen visualisiert werden (Abb. 1.1).



**Abb.1.1: FISH-Analysen mit *MYCN*-Sonden.**

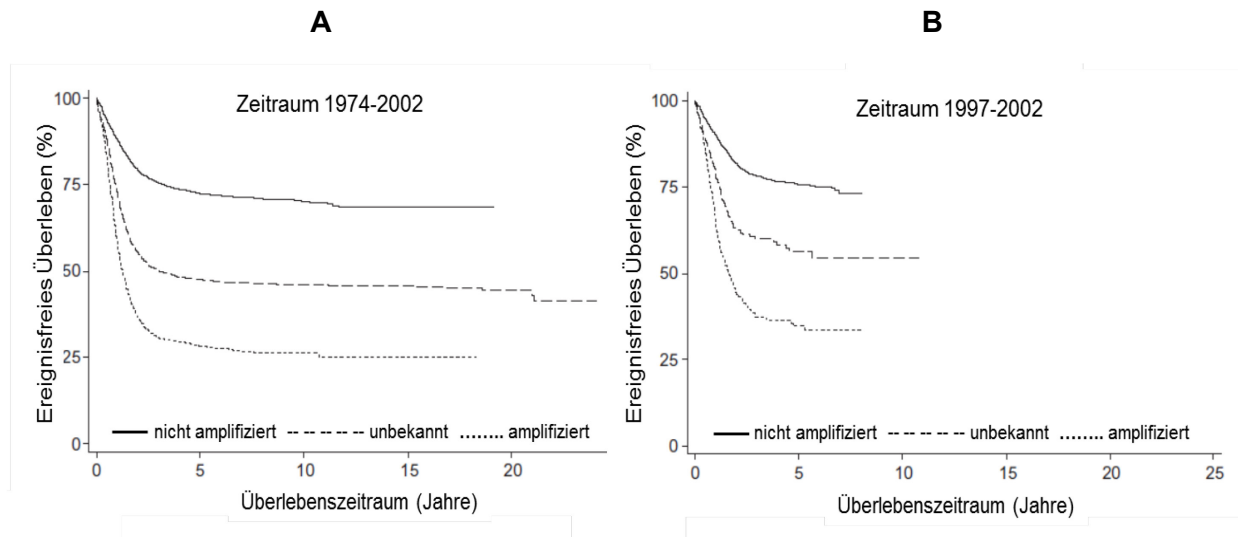
Gezeigt sind FISH-Analysen zum Nachweis von *MYCN*-Amplifikationen (rot) und Chromosom-Zentromeren (grün) in NB-Zellen.

- A)** In dieser Abbildung sind Zellen mit einer normalen Anzahl an *MYCN*-Kopien (zwei) und eine Zelle mit drei Kopien des Gens zu sehen (Mitte). Die Färbung der Chromosom-Zentromeren dient als interne Kontrolle.
- B)** Abbildung B zeigt Neuroblastom-Zellen mit *MYCN*-Amplifikationen, in denen eine Vielzahl von Kopien des Gens vorliegen. Die Zellkerne sind blau gefärbt (Schmitt *et al.*, 2008).

Die Amplifikationen treten in Form von extrachromosomalen DNA-Partikeln, sogenannten *double-minutes*-Chromosomen, oder als homogen gefärbte Regionen (*homogeneously staining regions* (HSR)) auf, wodurch bis zu 100 Kopien des Gens vorliegen können und diese sind mit einer hohen Expression des Proteins korreliert (Schwab, 1997). Die Genamplifikation von *MYCN* wird in ca. 20% aller NB-Fälle diagnostiziert und ist unabhängig vom Alter und Krankheitsstadium stets mit einer schlechten Prognose assoziiert (Westermann *et al.*, 2008).

Über die molekularen Ursachen dieses Phänomens, ist bisher wenig bekannt genetische Aberrationen, wie z.B. sogenannte *fragile sites* innerhalb von Chromosomen, scheinen dafür mitverantwortlich zu sein (Schwab *et al.*, 2003; Stallings *et al.*, 2007). So korreliert eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1, die in ca. 35% aller Neuroblastome vorkommt, mit *MYCN*-Amplifikationen und ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert (Fong *et al.*, 1992; White *et al.*, 2001). Verantwortlich ist wahrscheinlich ein *loss of heterozygosity* (LOH) in Höhe von Chromosom 1p36 und somit ein Verlust der hier befindlichen Gene. Eine Zunahme des Amplifikationsgrades im Krankheitsverlauf ist nicht festzustellen, die Kopienzahl des *MYCN*-Gens ist entsprechend der bestehenden heterogenen Merkmale bereits während der Tumorgenese festgelegt (Brodeur *et al.*, 1986). Auch in anderen neuroektodermalen Tumoren, wie z.B. im kleinzelligen Bronchialkarzinom, Retinoblastom, Rhabdomyosarkom, Medulloblastom, Glioblastom und im Astrozytom, sind Amplifikationen des *MYCN*-Gens nachgewiesen worden (Lee *et al.*, 1984; Garson *et al.*, 1985; Nisen *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1986; Strieder and Lutz, 2002). Es zeigt sich, dass alle Tumoren, die mit dieser genetischen Aberration einhergehen, aus Gewebe entstehen, in denen *MYCN* während der Frühentwicklung exprimiert wird (Hurlin, 2005).

Die Bedeutung der Amplifikation für die Prognose bei NB-Patienten wird bei Betrachtung der 10-Jahres-Überlebensrate deutlich: Bei Patienten mit normaler Anzahl des Gens liegt diese unabhängig vom Stadium und Zeitpunkt der Diagnose bei über 75%. Bei Patienten mit *MYCN*-Amplifikation sinkt die Überlebensrate auf unter 30% (Abb. 1.2) (Moroz *et al.*, 2011).



**Abb. 1.2: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von Patienten mit und ohne *MYCN*-Amplifikation.**

In den Graphen sind die ereignisfreien Überlebensraten von Patienten mit und ohne *MYCN*-Amplifikation über zwei unterschiedliche Zeiträume unabhängig vom Krankheitsstadium aufgeführt.

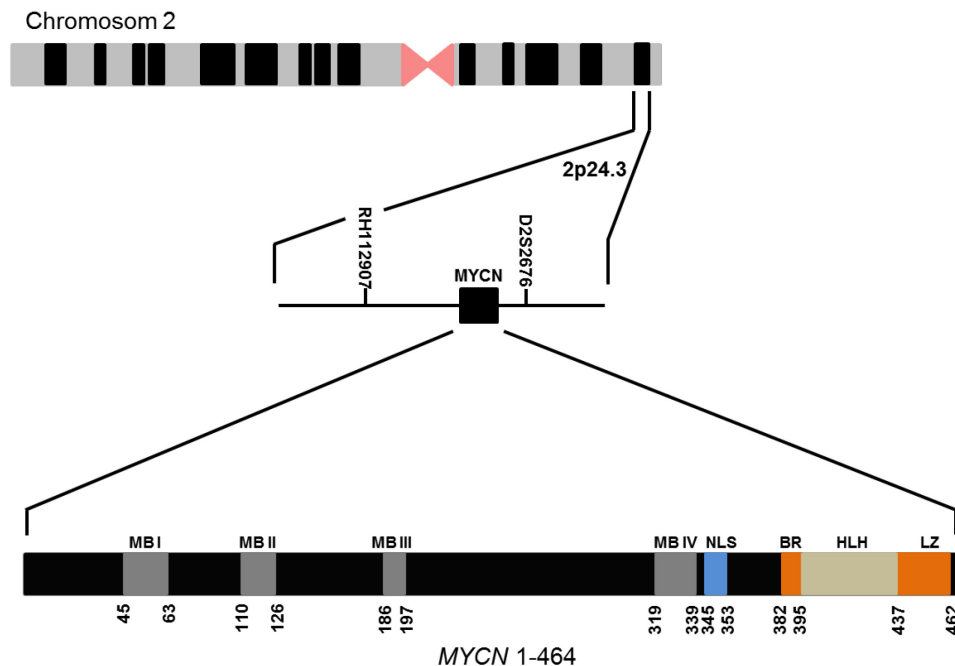
- A)** Überlebensrate von Neuroblastom-Patienten mit und ohne Amplifikation von *MYCN* über den Zeitraum von 1974-2002. Anhand der Verläufe ist zu erkennen, dass die Überlebensrate bei Amplifikation des Gens in frühen Jahren mit ca. 25% sehr gering war.
- B)** Überlebensrate von NB-Patienten über den Zeitraum von 1997-2002. Es wird deutlich, dass neue Therapien die Überlebensrate aller Gruppen verbessert haben. Bei Amplifikation liegt die Überlebensrate nun bei ca. 30%. Der Abstand der ereignisfreien Überlebensrate zwischen den drei analysierten NB ist etwa gleich geblieben (modifiziert aus Moroz *et al.*, 2011).

Ein Grund für die schlechte Prognose *MYCN*-amplifizierter Tumoren ist die häufig entwickelte Resistenz gegen gängige Chemotherapeutika (Berthold *et al.*, 1990). Vor diesem Hintergrund erscheint eine *in-vitro*-Beobachtung paradox: Eine gezielte *MYCN*-Überexpression *in vitro* führt Zellen zu einer erhöhten Sensibilisierung gegenüber Apoptose-induktoren wie Doxorubicin oder Interferon- $\gamma$  (Lutz *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2000; van Noesel *et al.*, 2003).

Die Relevanz der *MYCN*-Expression für die Pathogenese des Neuroblastoms wird durch ein Mausmodell von William A. Weiss besonders deutlich: Eine auf das neuroektodermale Gewebe beschränkte Überexpression von *MYCN* führt zur spontanen Entwicklung von Neuroblastomen in den Mäusen (Weiss *et al.*, 1997).

### 1.3 Die *MYC*-Familie

Das durch *MYCN* exprimierte 64 kDa große Phosphoprotein gehört, wie seine beiden Homologe c-Myc und MycL, zu den bHLHZip-Transkriptionsfaktoren, die eine Reihe struktureller Gemeinsamkeiten aufweisen (Aubry and Charron, 2000) (Abb. 1.3).

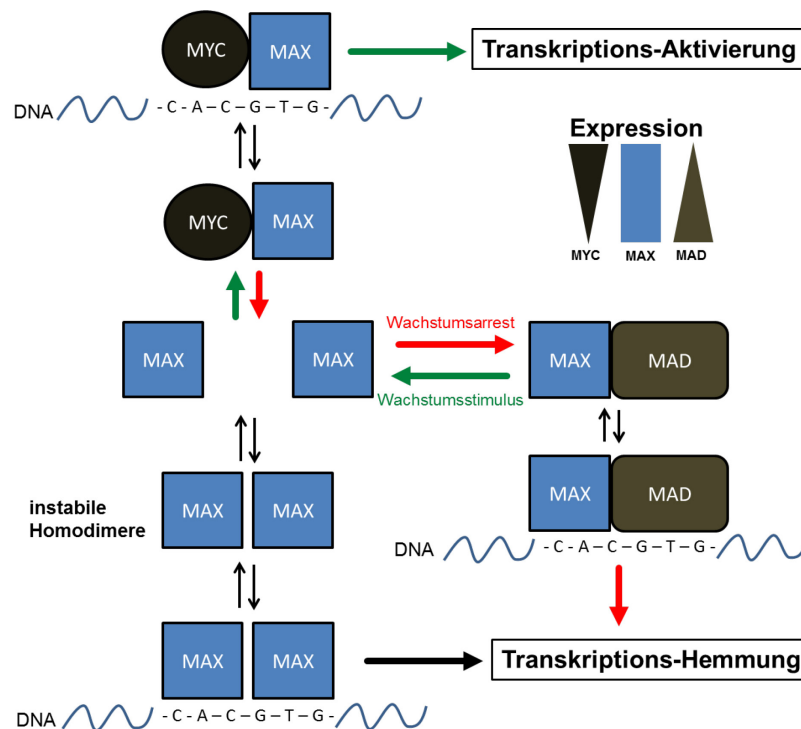


**Abb. 1.3: Lokalisierung und Struktur des humanen *MYCN*-Gens.**

Die Lokalisierung von *MYCN* im Bereich 2p24.3 auf Chromosom 2 ist im oberen Bereich der Abbildung aufgeführt. Die Struktur des Onkoproteins MycN (Isoform 1) ist mit den konservierten Bereichen unten dargestellt: MycN-Boxen (MB) I-IV, Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), basische Region (BR), Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH) und Leuzin-Zipper (LZ).

Die Regulation der *MYC*-Gene wird durch die Partnerproteine Max und Mad bestimmt. Alle besitzen das bHLHZip-Motiv und können Heterodimere bilden, die um die Bindung an DNA-Abschnitte, den so genannten E-Boxen (5'-CACGTG-3'), konkurrieren (Amati and Land, 1994). Die Protein-Protein-Interaktion wird dabei durch die HLHZip-Domäne, die Bindung an DNA durch die basische Region vermittelt. Um transkriptionsaktivierend zu wirken, muss es zu einer Dimerisierung der Myc- und Max-Proteine kommen (Amati *et al.*, 1993). Die Heterodimere von Max und Mad bewirken hingegen eine aktive Stilllegung der betroffenen Loci. Da Max ein langlebiges Protein ist, Myc- und Mad-Proteine aber nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzen, kann durch die kontrollierte Expression von Myc und Mad eine abgestimmte Regulation der Zielgene erreicht werden (Abb. 1.4) (Baudino and Cleveland, 2001; Hurlin and Huang, 2006; Rottmann and Luscher, 2006).





**Abb. 1.4: Das Myc-Max-Mad-Netzwerk.**

Modell des Myc-Max-Mad-Transkriptionsnetzwerks für die Wachstumskontrolle. Myc/Max-Dimere binden an die DNA und aktivieren die Proliferation. Max-Homodimere und Max/Mad-Heterodimere agieren als Antagonisten von Myc/Max und konkurrieren um die DNA-Bindestellen. Binden diese Dimere, kommt es zur Hemmung der Transkription und ein Proliferationsarrest wird ausgelöst. Das Gleichgewicht der unterschiedlichen Komplexe wird durch die bevorzugte Heterodimerisierung von Max mit Myc oder Mad aufrechterhalten. Während das Expressionslevel von Max relativ konstant ist, variiert die Expression von Myc und Mad sehr stark. Durch ihre kurze Halbwertszeit kann so die Transkription gesteuert werden (modifiziert aus Amati and Land, 1994).

## 1.4 Biologische Funktion der MYC-Gene

Die MYC-Gene gehören zu den erstentdeckten Onkogenen, die mit malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden (Alt *et al.*, 1986). Innerhalb dieser homologen Proteinfamilie gibt es neben strukturellen Eigenschaften (siehe Abschnitt 1.3) auch viele übereinstimmende proteinchemische und biologische Funktionen (Nesbit *et al.*, 1999; Aubry and Charron, 2000). Diese tragen entscheidend zur Entstehung von Tumoren bei und sind oft für den pathologischen Phänotyp verantwortlich. Die MYC-Gene sind unter anderem an der Steuerung von Proliferation, Proliferationsarrest und Apoptose beteiligt. Durch eine erhöhte Expression kann die Abhängigkeit der Zellen von Wachstumsfaktoren unterdrückt und das Zellwachstum beschleunigt werden. Wichtige metabolische Schlüsselwege, wie die Proteinbiosynthese und der antimitogene Signalweg über die TGF- $\beta$ -Kaskade können blockiert werden (Lutz *et al.*, 2002). Durch die teilweise außer Kraft gesetzten *Checkpoint*-Programme des Zellzyklus kommt es gehäuft zu Akkumulationen von Mutationen und veränderten Chromosomensätzen. Gerade sehr aggressive Neuroblastome mit

amplifiziertem *MYCN*-Gen besitzen oft tetraploide Chromosomensätze (Oberthuer *et al.*, 2009).

Deutlich wird die funktionelle Homologie der beiden Gene dadurch, dass bei Integration der kodierenden Sequenz von *MycN* in einen *Myc*-Lokus fast alle Funktionen von *c-Myc* in einem Mausmodell ersetzt werden können (Malynn *et al.*, 2000).

Gemeinsame Zielgene von *MYCN* und dem prominentesten Vertreter aus der *Myc*-Familie *c-MYC*, sind z.B. *ODC*, *PTMA*, *TERT*, *TRRAP*, *CAD*, *NCL* und einige ribosomale Gene (Lutz *et al.*, 1996; Boon *et al.*, 2001; Nikiforov *et al.*, 2002).

Insgesamt weisen die regulierenden Eigenschaften von *MycN* einige Homologien zu *c-Myc* auf. Durch *MycN* werden, wie auch durch *c-Myc*, hauptsächlich Gene induziert, die für die Proliferation und den Wiedereintritt ruhender (quieszenter) Zellen in den Zellzyklus verantwortlich sind (Lutz *et al.*, 1996).

So wurde festgestellt, dass eine hohe Expression von *MycN* mit einer Akkumulation des Zellzyklus- und Tumorsuppressorgens *p53* korreliert. Möglicherweise wird dies durch eine direkte Regulation von *p53* durch *MYCN* (Chen *et al.*, 2010) oder indirekt über *MDM2* vermittelt (Slack *et al.*, 2005). Bei diesem Weg wird die Stabilisierung von *p53* über den *MDM2* - *p14<sup>ARF</sup>*-Signalweg hervorgerufen, der einen Schutz vor *MYC*-induzierten Tumoren darstellt und bereits für *c-MYC* und *L-MYC* beschrieben wurde (Eilers, 1999; Eischen *et al.*, 1999). Durch die so entstehende Akkumulation von *p53* wird die Expression des *CDK*-(*cyclin-dependent kinase*) Inhibitor 1 (*p21<sup>WAF1</sup>*) herabreguliert. Dadurch wird der *G1*-Arrest in diesen Zellen gestört und die Zellen proliferieren unkontrolliert (Bell *et al.*, 2007). Normalerweise wird durch *p21<sup>WAF1</sup>* die Aktivität des *Zyklin-E/CDK2*-Komplexes inhibiert und ein *G1*-Arrest nach *DNA*-Schädigung ausgelöst (Sherr and Roberts, 1999).

Eine weitere Folge von *MYCN*-Amplifikationen ist die Stabilisierung von *Aurora A*. *Aurora A* ist ebenfalls ein Zellzyklus relevantes Gen und für den Übergang von der *G2*- zur *M*-Phase essentiell. Des Weiteren wird es für die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates während der Zellteilung benötigt (Ouchi *et al.*, 2004; Sasai *et al.*, 2008). Neben diesen Funktionen konnte gezeigt werden, dass *Aurora A* indirekt zur Stabilisierung von *MycN* beiträgt, indem es die Ubiquitin vermittelte Degradierung des Proteins durch das Proteasom verhindert und so die Menge an *MycN* weiter erhöht (Otto *et al.*, 2009).

Trotz vieler gemeinsamer Zielgene und funktioneller Eigenschaften ist die zeitliche und regionale Expression der *MYC*-Gene aber sehr unterschiedlich. *c-MYC* ist ein ubiquitäres Protein und kann in fast allen proliferierenden Zellen des gesamten Organismus nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von *MYCN* gewebespezifisch und zeitlich begrenzt ist. Während der Embryogenese einer Maus kann *MYCN*-RNA im Neuralrohr, den Primitivstreifen, den Extremitätsknospen und im Herz nachgewiesen werden. In der weiteren Entwicklung, der Organogenese, beschränkt sich die Expression auf

Leber, Magen, Lunge und Haarfollikel. Bei Geburt ist die RNA nur noch in Nieren, Lungen, Gehirn, Herz und Darm zu finden, verschwindet aber einige Tage nach der Geburt fast komplett. *MYCN* wird also nur während der frühen Entwicklungsphase exprimiert (Zimmerman *et al.*, 1986; Yamada, 1990).

Durch die Bedeutung der *MYC*-Gene in unterschiedlichen malignen Tumoren und die damit häufig verbundene hohe Expression stellen sie potentiell gute Ziele für verschiedene Therapien dar. Insbesondere *MYCN* ist ein interessantes Ziel für immuntherapeutische Ansätze: Die Expression im gesunden Gewebe ist regional und zeitlich begrenzt, aber gerade in aggressiven Tumoren mit *MYCN*-Amplifikation stark erhöht (Himoudi *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2010; Gustafson and Weiss, 2010).

### **1.5 Behandlung des Neuroblastoms und passive Immuntherapie**

Das Standardbehandlungsverfahren des NB ist abhängig von Ausmaß und Lokalisation des Tumors. In der Regel wird mit einer chirurgischen Intervention zur Entfernung des Primärtumors begonnen, gefolgt von einer Chemo- und Strahlentherapie. Diese werden unter anderem mit einer MIBG-Therapie, Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation und einer Behandlung mit Retinsäure fortgesetzt.

Neben den Standardverfahren werden zunehmend auch immuntherapeutische Ansätze verfolgt, um die Heilungsrate des NB zu verbessern (Lode and Reisfeld, 2000; Navid *et al.*, 2009; Seeger, 2011). Bei Immuntherapien werden die passive und die aktive Variante unterschieden. Bei der passiven Therapie werden tumorspezifische Antikörper verabreicht, die Antigene des Tumors binden und eine Immunreaktion auslösen.

Ein Beispiel hierfür ist die Behandlung mit dem Disialogangliosid GD<sub>2</sub>-spezifischen human-/murin-chimären-Antikörper ch14.18 (Simon *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2011). Da Neuroblastomzellen auf ihrer Oberfläche eine hohe GD<sub>2</sub>-Expression aufweisen, eignet sich dieser Antikörper besonders zur Behandlung des Neuroblastoms. ch14.18 wird aktuell in verschiedenen klinischen Studien eingesetzt, wobei zur Verstärkung der passiven Immuntherapie kombinatorische Applikationen mit Zytokinen untersucht werden. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass bei kombinierter Anwendung von ch14.18 mit GM-CSF, IL-2 und 13-cis-Retinsäure eine signifikante Erhöhung der ereignisfreien und allgemeinen Überlebensrate von Hochrisiko-NB-Patienten des Stadiums 4 erzielt werden kann (Yu *et al.*, 2010).

## 1.6 Aktive Immuntherapie

Im Gegensatz zur passiven Therapie sollen bei einer aktiven Immuntherapie körpereigene Immunzellen gegen Tumor-assoziierte Selbstantigene (TAA) aktiviert und zur Bekämpfung der Tumorzellen angeregt werden.

Im Allgemeinen beruhen aktive Impfungen auf Verwendung abgeschwächter Viren oder Viruspartikeln, die neben der eigentlichen Immunantwort das immunologische Gedächtnis induzieren sollen. Dadurch wird eine langanhaltende Immunität gegen die verabreichten Keime entwickelt, da das Erscheinungsbild der Viren unverändert bleibt.

Eine aktive Impfung gegen Tumoren steht einer weitaus größeren Herausforderung gegenüber: Meist handelt es sich bei den „Impftargets“ um Tumor-assoziierte Selbstantigene, welche oft schwach immunogen sind und sehr heterogen von genetisch instabilen Zellen exprimiert werden. Die Tumorzellen mutieren häufig und verstecken sich vor der zellulär-vermittelten Immunantwort in der Mikroumgebung des Tumors (*tumor microenvironment-TME*) (Xiang *et al.*, 2008). Um mit einer aktiven Immuntherapie eine effektive Immunantwort zu induzieren, muss neben diesen Faktoren auch die Selbsttoleranz des Immunsystems überwunden werden.

Diese wird in zentrale und periphere Toleranz unterteilt und soll vor Autoimmunreaktionen schützen. Mit Hilfe einer aktiven Immuntherapie gegen Krebs sollen diese Toleranzen spezifisch durchbrochen und eine Immunantwort gegen ein ausgewähltes Selbstantigen erzeugt werden. Während bei der zentralen Toleranz naive T-Zellen schon während ihrer Reifung im Thymus einer negativen und positiven Selektion unterliegen, werden durch die periphere Toleranz autoreaktive reife T-Zellen, die den Selektionen im Thymus entkommen sind, in peripheren Geweben blockiert bzw. gehemmt, um Autoimmunreaktionen zu unterbinden.

### 1.6.1 Zentrale Toleranz

Die Reifung der aus dem Knochenmark stammenden T-Vorläuferzellen findet im Thymus statt. Hier durchlaufen sie die entscheidenden Selektionsschritte, an deren Ende 95% aller dort gebildeten Zellen, aufgrund von Autoreaktivität oder Nichterkennung von MHC-Molekülen, in die Apoptose geleitet werden.

Während der Reifung im Epithelzellgewebe des Thymus bilden die T-Vorläuferzellen den T-Zell-Rezeptor (TCR) und die Co-Rezeptoren CD4 und CD8 aus, die für die positive Selektion von Bedeutung sind. Wenn diese Rezeptoren MHC-Moleküle überhaupt nicht erkennen oder zu stark an diese binden, werden die jeweiligen Lymphozyten in die Apoptose geleitet (positive Selektion). Weisen sie hingegen eine geringe Affinität zu eigenen

MHC-Molekülen auf, können die T-Lymphozyten die kortikale Zone des Thymus durchwandern. Die verbliebenen doppelt-positiven-Zellen wandern weiter durch die Medulla des Thymus und treffen dabei auf dendritische Zellen und Makrophagen, die Komplexe aus Selbst-MHC/Selbstantigen exprimieren. Binden die TCR der T-Zellen nun an diese Komplexe, werden sie ebenfalls eliminiert und in die Apoptose geleitet (negative Selektion). Nur die T-Zellen, die dieser Auslese entgehen, reifen weiter, verlassen entweder als  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zelle den Thymus und wandern schließlich zu den sekundären lymphatischen Organen. Aus der Selektion resultierend sind die meisten T-Zellen, die den Thymus verlassen, selbsttolerant.

Für eine Immuntherapie sind aber nur die T-Zellen interessant, die der Selektion anhand ihrer Affinität zu eigenen MHC-Komplexen entgehen. Diese T-Zellen überstehen die positive Selektion im Thymus wahrscheinlich durch Kreuzreaktivität zu Selbst-MHC-Molekülen, wobei ein Teil der alloreaktiven T-Zellen Strukturen der fremden MHC-Moleküle, unabhängig von den gebundenen Peptiden, erkennen. Andere reagieren auf allogene MHC-Moleküle mit einer Peptid-abhängigen Art und sind folglich allorestingiert und Peptid-spezifisch (Rotzschke, 1991; Sherman, 1993). Des Weiteren können manche Lymphozyten den Thymus unbeachtet durchwandern, weil nicht alle Selbstantigene in ausreichender Menge oder erst später im Leben präsentiert werden (Matzinger, 1993). All diese potentiell autoreaktiven Thymozyten bleiben kompetent, verlassen den Thymus und können durch antigenpräsentierende Zellen (APC), die einen passenden MHC:Selbstpeptid-Komplex in ausreichender Menge exprimieren, aktiviert werden (Zehn, 2006).

Das Ziel einer aktiven Immuntherapie gegen Krebs besteht nun darin, die zur Verfügung stehenden selbstreaktiven CTL spezifischer Antigene, die den Thymus verlassen, zu aktivieren und zu vermehren und schließlich noch die periphere Toleranz zu durchbrechen.

### **1.6.2 Periphere Toleranz**

Wie beschrieben, werden nicht alle im Körper befindlichen Peptide (Selbstantigene) im Thymus präsentiert, so dass in der Peripherie Antigen-Epitope zu finden sind, die Immunreaktionen trotz Selektion auslösen könnten. Diese Selbstreaktionen werden durch die periphere Toleranz verhindert. Diese ist für die Regulation der reifen T-Zellen in der Peripherie des Körpers verantwortlich, wobei drei Mechanismen unterschieden werden, und zwar die Ignoranz, die Deletion bzw. die Regulation im Sinne von Anergie und die Suppression der T-Zellantwort (Deviation) (Stockinger, 1999).

Die periphere Ignoranz entspricht einer Nichtaktivierung von T-Zellen und kann durch eine zu geringe Präsentationsdichte eines Antigens hervorgerufen werden; fehlen ausreichende Stimulanzen, ignorieren die T-Zellen ihr Antigen (Ochsenbein *et al.*, 1999). Auch die

Vermeidung von Kontakt zwischen Antigen und T-Zellen, welche in immunprivilegierten Geweben, wie den Testes und dem Auge, vorkommen, wird zur peripheren Ignoranz gezählt.

Von Deletion wird gesprochen, wenn eine T-Zelle durchgehend von einem Antigen in hohen Konzentrationen stimuliert oder nach Aktivierung erneut aktiviert wird. Dann tritt die T-Zelle in Apoptose und reagiert so auf die starken Antigen-Reize (Ehl *et al.*, 1998). Zur Anergie kommt es, wenn einer T-Zelle ein Antigen ohne co-stimulatorische Moleküle präsentiert wird. Durch die unvollständige Aktivierung wird die Zelle sozusagen paralysiert, sie überlebt, kann aber auch durch eine spätere Stimulierung durch Antigene nicht reaktiviert werden (Jenkins and Schwartz, 1987). Neben fehlenden Co-Stimulatoren können aber auch inhibitorische Moleküle wie CTLA-4 (CD152) oder PD-1, zu einem der Anergie vergleichbaren Phänotyp der T-Zellen führen (Probst *et al.*, 2005).

Neben diesen passiven Regulationsmechanismen gibt es aber auch eine aktive Regulation, die als Suppression bezeichnet wird. Diese wird aktiv durch regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) vermittelt, welche sowohl autoreaktive T-Zellen als auch andere unerwünschte Immunreaktionen inhibieren können (Groux, 2001). Über die Existenz verschiedener  $T_{reg}$ -Zellen wird noch diskutiert; sicher ist aber die Existenz von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, die sich durch die Expression von FoxP3 auszeichnen und zu den natürlichen  $T_{reg}$ -Zellen gezählt werden. Diese Zellen reifen im Thymus (Powrie and Maloy, 2003). Es gibt ebenfalls regulatorische T-Zellen, die sich in der Peripherie, vermutlich durch eine Art Induktion, bilden (Jonuleit *et al.*, 2001). Diese entstehen wahrscheinlich aus  $CD4^+$  T-Zellen in Anwesenheit geringer Antigenmengen durch Interaktion mit tolerogenen dendritischen Zellen (DCs) oder natürlichen regulatorischen T-Zellen (Jonuleit and Schmitt, 2003).  $T_{reg}$  regulieren andere T-Zellen in ihrer Umgebung durch die Ausschüttung von Zytokinen wie TGF- $\beta$  und Interleukin-10, wobei ein direkter zellulärer Kontakt nötig ist (Schwartz, 2005).

Durch die Homöostase von aktivierten Effektor-T-Zellen ( $T_{eff}$ ) und regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) entsteht ein ausgeglichenes Verhältnis gegenüber dem eigenen Gewebe (Toleranz) und der Bekämpfung von Fremdstoffen und Pathogenen (Immunantwort).

Kommt es zu Verschiebungen der Homöostase, können Autoimmunerkrankungen entstehen. Diese können z.B. durch Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen durch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Fremd-Antigen und körpereigenen Peptiden als Folge einer Infektion hervorgerufen werden. Dieses Phänomen wird auch als mögliche Ursache für Diabetes mellitus Typ I, Arthritis und unterschiedliche Krebserkrankungen diskutiert. Des Weiteren kann auch eine Gewebeerstörung, z.B. durch Krebserkrankungen, und die damit verbundene Freisetzung von Autoantigenen zur Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen führen. Die Verschiebung des Gleichgewichts der Homöostase muss aber nicht zwangsläufig zu Krankheiten führen. So kann bzw. soll mit einer aktiven Immuntherapie das Kräfteverhältnis

der  $T_{eff}$  gegenüber bestimmten Selbstantigenen therapeutisch verschoben und eine spezifische Immunantwort gegen ausgewählte Selbstantigene erzeugt werden.

### **1.7 Tumor-assoziierte Antigene und selbstreaktive T-Zellen**

In manchen Tumoren kommt es zu einer Überexpression Tumor-spezifischer Proteine, die in zwei Gruppen unterteilt werden können: zum einen in Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und zum anderen in Tumor-spezifische Antigene (TSA). TAA sind zelluläre Proteine mit normaler Funktion, die auch von gesunden Zellen exprimiert werden. Die pathogene Transformation von Tumorzellen kann aber zu einer Überexpression dieser Proteine führen.

TSA sind Neoantigene, die meist durch Mutationen entstehen und spezifisch nur in den transformierten Zellen des Tumors zu finden sind (Buonaguro *et al.*, 2011).

Für eine aktive Immuntherapie sind besonders die TAA von Bedeutung, die nur in bestimmten Geweben oder in bestimmten Entwicklungsstadien und ansonsten nur in den malignen Zellen exprimiert werden (Sandberg *et al.*, 2000). Ein besonders guter Kandidat stellt hierbei *MYCN* dar; es wird in ausreichenden Menge von transformierten Tumorzellen, aber nicht vom gesunden Gewebe exprimiert und ist entscheidend für den onkologischen Phänotyp verantwortlich.

Da alle degradierten Proteine einer Zelle als Epitope in MHC-I/Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert werden (siehe Abschnitt 1.8), werden auch Epitope der TAA bzw. TSA präsentiert. Die hohe Expression der TAA führt schließlich dazu, dass mehr Epitope auf die Zelloberfläche gelangen und die Präsentationsdichte zunimmt. Dies bietet die Möglichkeit, eine gezielte Immunantwort gegen eben diese Zellen zu induzieren. Denn durch die hohe Menge an TAA-Epitopen kann die Niedrigdosistoleranz der peripheren Toleranz durchbrochen werden. Die Co-Stimulation der zytotoxischen T-Zellen kann dabei durch die inflammatorische Umgebung des Tumorgewebes hervorgerufen werden (Tuting *et al.*, 2000). Denn zur Aktivierung von T-Zellen muss, neben der Bindung der MHC/Peptid-Komplexe, eine zusätzliche Stimulierung (zweites Signal) mittels Co-Rezeptoren vermittelt werden. Fehlt diese, entstehen Anergien oder die T-Zellen werden in die Apoptose geleitet. Hinzu kommt, dass durch die Tumor-spezifische Expression das Risiko einer Autoimmunerkrankung durch selbstreaktive Lymphozyten minimal ist.

Es stellt sich die Frage, warum das eigene Immunsystem eigentlich keine effektive Immunantwort gegen Tumoren induziert, obwohl Tumor-Selbstantigen spezifische T-Zellen im Blut von Krebspatienten nachgewiesen werden können, wie auch bei NB-Patienten mit *MYCN*-Amplifikationen MycN spezifische T-Zellen gefunden wurden (Sarkar and Nuchtern, 2000).

Eine Ursache für diese Beobachtung ist das sogenannte *Immunoediting*. Durch das *Immunoediting* wird ein Tumor sozusagen „geformt“, um ungestört entstehen zu können. Der Prozess des *Editing* wird in drei Phasen unterteilt, die auch als die „drei E's“ bezeichnet werden: Elimination (*elimination*), Gleichgewicht (*equilibrium*) und Entkommen (*escape*). Dabei entspricht die Phase der Elimination dem gesunden Immunsystem, bei dem transformierte, entartete Zellen von Immunzellen erkannt und eliminiert werden. Während des Equilibriums entsteht ein immunvermitteltes Gleichgewicht zwischen verbliebenen Tumorzellen und der Immunüberwachung. In der dritten Phase entkommen die Tumorzellen der Überwachung und die Zellen können unkontrolliert proliferieren – ein Tumor entsteht (Kim *et al.*, 2007). Das bedeutet, dass im gesunden Organismus tatsächlich entartete Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden können. Sobald sich aber Tumorzellen durch ihre malige Transformation dem Immunsystem entziehen, kann ein Tumor entstehen. Die Bedeutung dieses Vorgangs wird durch die Beobachtung belegt, dass NB, in denen Tumor-infiltrierende Lymphozyten nachgewiesen werden können, mit einer besseren Prognose assoziiert sind (Lauder and Aherne, 1972).

### **1.8 Präsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle**

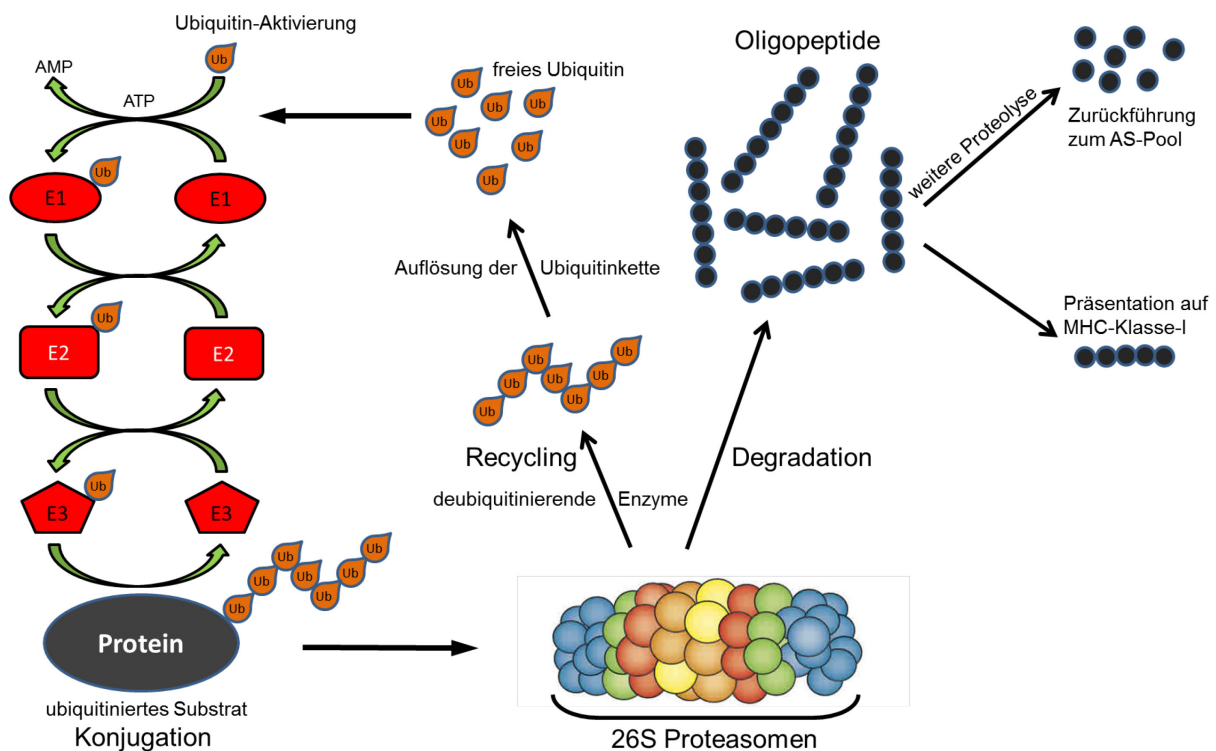
Das Ziel einer aktiven Immuntherapie ist die Vermehrung und Aktivierung vorhandener Tumor-/Selbstantigen-spezifischen T-Zellen. Dabei ist die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen ein kritischer Prozess, der nach klassischer Hypothese zwei aktivierender Signale bedarf. Das erste Signal wird über den T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt, welcher spezifische MHC I/Peptid-Komplexe erkennt und bindet (Signal 1). Durch die Interaktion von co-stimulatorischen Molekülen, wie die Bindung von CD28 (T-Zelle) an CD80/86 (B7.1/ B7.2) auf den DC, wird das zweite Signal vermittelt und die T-Zelle aktiviert. Damit wird die klonale Expansion und Ausdifferenzierung zur Antigen-spezifischen T-Zelle eingeleitet. Die Aktivierung von Gedächtniszellen erfolgt nach einem ähnlichen Muster, allerdings zeigen diese einen schnelleren Eintritt in die Expansionsphase, was auf veränderte Bedürfnisse bei der Co-Stimulation zurückzuführen ist (Gourley *et al.*, 2004).

Mittlerweile konnte bewiesen werden, dass für die Aktivierung naiver CD8 T-Zellen noch ein drittes Signal notwendig ist, welches durch inflammatorische Zytokine wie Typ-I-Interferone oder IL-12 vermittelt wird. Mit Hilfe dieser Signale wird festgelegt, ob die CD8<sup>+</sup> T-Zellen vollständig aktiviert oder tolerant werden (Curtsinger *et al.*, 1999; Curtsinger *et al.*, 2005; Curtsinger *et al.*, 2007).

Für eine aktive Immuntherapie ist das erste Signal, also die Präsentation der Antigene durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf APC entscheidend, da in diesem Schritt die Spezifität der aktivierten CTL bestimmt wird (Goldberg *et al.*, 2002). Um diesen Mechanismus für die



Präsentation eines Tumor-assoziiertes-Antigens einzubinden, wird die Ubiquitin-/Proteasom-abhängige Proteolyse genutzt, die entscheidend zur Präsentation beiträgt (Goldberg *et al.*, 1997). Durch diesen lebenswichtigen Prozess aller eukaryotischen Zellen wird der Protein-Metabolismus der meisten zellulären Proteine reguliert (Hershko and Ciechanover, 1998). So werden nicht nur Proteine von zytoplasmatischen Pathogenen, sondern auch zelleigene defekte, falsch gefaltete oder veraltete Proteine durch die Proteolyse degradiert. Auch TAA, die in hohem Maße in Tumorzellen exprimiert werden, unterliegen diesem Prozess und werden durch MHC-Moleküle präsentiert. Bei der Ubiquitinierung können mehrere Ubiquitin-Moleküle in Form einer Poly-Ubiquitinkette mit dem Zielprotein verknüpft werden. Diese post-translationale Modifikation führt dazu, dass die so markierten Proteine spezifisch durch das Proteasom erkannt und der proteasomalen Degradation zugeführt werden (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Zyklus der Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation.**

Abgebildet ist der Zyklus, der zur Degradation eines Proteins durch das Proteasom führt. Dieser Weg beinhaltet zwei wichtige Schritte: zum einen die Konjugation (links), zum anderen die Degradation (rechts). Bei der Konjugation werden mindestens drei Ubiquitine über verschiedene Ub-Ligasen (E1-3) an das jeweilige Substrat geheftet. Es folgt die Degradation des Proteins in Oligopeptide. Dabei werden die Ubiquitinreste vom Substrat getrennt und in den Pool freier Ubiquitine zurückgeführt (Recycling).

Das Proteasom ist eine makromolekulare Protease, die aus zwei regulatorischen 19S-Komplexen (*cap*) besteht, die den proteolytisch aktiven Kernkomplex, das 20S-Proteasom, flankieren. Es gibt zwei Arten von 20S-Proteasomen, das normale konstitutive und ein

konditionelles, Zytokin-induziertes sogenanntes Immunoproteasom. Die durch das Proteasom abgebauten poly-ubiquitinierten Proteine werden in Oligopeptide zerlegt und in die Poly-Ubiquitinkette recycelt.

Die Oligopeptide haben eine Länge von 3-25 AS, werden zum größten Teil hydrolysiert und dem Aminosäurepool zurückgeführt. Insgesamt ist die Prozessierung und die Präsentation der Antigene durch das Proteasom unter normalen Umständen sehr ineffizient: Es müssen, abhängig von der Affinität der Epitope zu MHC-Klasse-I-Molekülen, 500 bis 10000 Peptide durch das Proteasom gebildet werden, um ein Epitop zu präsentieren (Kisselev *et al.*, 1999; Fruci *et al.*, 2003; Princiotta *et al.*, 2003).

Eine Verbesserung der Präsentation wird durch das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) hervorgerufen, welches durch Induktion einer Immunantwort sekretiert wird. Erst durch IFN- $\gamma$  kommt es zur Induktion von Bestandteilen des Immunsystems, die für die Präsentation der Antigene ausschlaggebend sind: So werden neben den *antigen peptide transporter* (TAP), den schweren Ketten der MHC-Klasse-I-Moleküle und dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin auch die proteasomalen Untereinheiten LMP2 und LMP7 ( $\beta$ 1-i,  $\beta$ 2-i und  $\beta$ 5-i) gebildet, die Bestandteile des sogenannten Immunoproteasoms sind (Frentzel *et al.*, 1994). Im Unterschied zum normalen Proteasom weist das Immunoproteasom eine modulierte Schnittstellenspezifität auf, welche die Präsentation hochaffiner Epitope fördert. Zudem kommt es durch Anlagerungen der genannten Untereinheiten zu einer Konformationsänderung im Proteasomkomplex, der die Aufnahme und Ausschleusung von Substraten erleichtert (York *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2000). Unabhängig von dieser *gating*-Funktion führt die Umlagerung im Proteasom zu einer verbesserten Antigenpräsentation bestimmter viraler und tumoraler T-Zell-Epitope (Sijts *et al.*, 2002). Die im Immunoproteasom entstandenen Peptidfragmente werden schließlich mittels TAP ins Endoplasmatische Retikulum transportiert. TAP's gehören zur großen Familie der ABC-Membrantransporter-Proteine. Diese Proteine besitzen eine ATP-bindende Kassette (ATP binding cassette - ABC) und transportieren bevorzugt spezifische DNA-Fragmente mit einer Länge von 8-12 AS über Zellmembranen. Dieses entspricht in der Länge der Bindungsspezifität der MHC-Klasse-I-Moleküle (York *et al.*, 1999). Durch die Anlagerung eines Peptids in die Antigenbindungsstelle eines MHC-Komplexes wird dieser stabilisiert und kann über den Golgi-Apparat auf die Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) transferiert werden, wo eine spezifische Präsentation für die TCR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen stattfindet (Abb. 1.6).

Insgesamt wird durch IFN- $\gamma$  die Anzahl und Variabilität der MHC-Klasse-I präsentierter Epitope auf Zellen gefördert und die Immunantwort verstärkt (Boes *et al.*, 1994; Sijts and Kloetzel, 2011).

## 1.9 DNA-Vakzine und Applikationsformen

Für die Entwicklung aktiver Immuntherapien zur Behandlung von Tumoren werden unterschiedlichste Impfstoffe, wie z.B. Peptid-Vakzine oder Tumorlysate etc. eingesetzt (Aly, 2012).

In dieser Arbeit wurden DNA-Vakzine verwendet, da sie einige entscheidende Vorteile bieten: Sie sind hoch immunogen, kostengünstig, einfach in der Handhabung, in großen Mengen kontaminationsfrei herzustellen und können ohne Stabilitätsverlust über längere Zeiträume gelagert werden (Eschenburg *et al.*, 2010; Fioretti *et al.*, 2010).

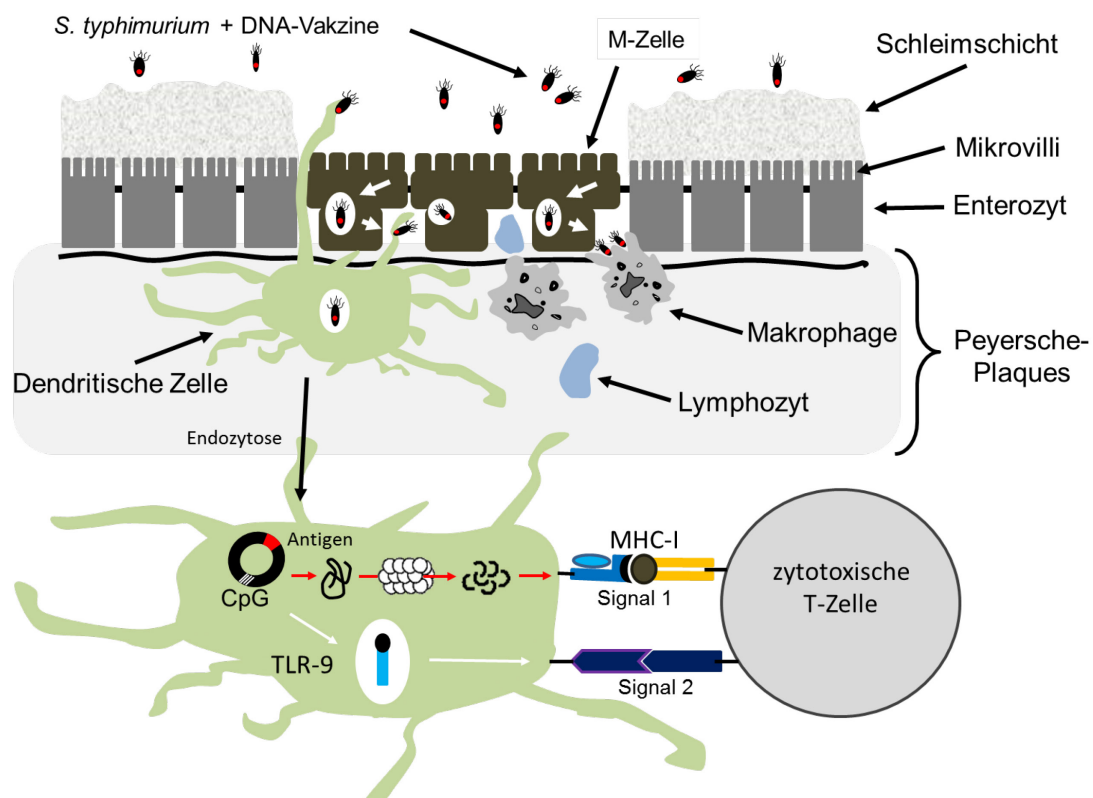
Die Entwicklung von DNA-Impfstoffen begann schon in den frühen 1960er Jahren. Damals gelang es durch eine subkutane Applikation von gereinigter Polyomavirus-DNA Polyoma-spezifische Antikörper zu induzieren, die in der Lage waren, die Tumorbildung in jungen Hamstern zu unterbinden (Atanasiu *et al.*, 1962). Erst Jahre später, zu Beginn der 90er Jahre, bekam die Immunisierung durch Injektion nackter DNA neue Bedeutung: Durch injizierte Plasmide, kodierend für Chloramphenicol-Acetyltransferase, Luziferase, und  $\beta$ -Galaktosidase, die in Wirtszellen persistierten, konnte eine lang anhaltende Expression der Gene nachgewiesen werden (Wolff *et al.*, 1990). In weiteren Experimenten wurde dann gezeigt, dass so eine langlebige und Zell-vermittelte wie auch humorale Immunantwort gegen spezifische Antigene hervorgerufen werden kann, die neben der Induktion von Antigen-spezifischen Antikörpern auch zur Stimulierung spezifischer CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen führt (Fynan *et al.*, 1993; Donnelly *et al.*, 1994). So konnten Mäuse, die intramuskulär mit einem für das Influenza-Nukleoprotein NP kodierenden Expressionsplasmid geimpft wurden, vor einer letalen Dosis Influenza-Viren geschützt werden (Montgomery *et al.*, 1993; Ulmer *et al.*, 1993; Donnelly *et al.*, 1995).

Bei der Immunisierung mit DNA-Vakzinen tragen viele Faktoren zu ihrer Wirksamkeit bei. So wird durch die Wahl der Applikationsmethode festgelegt, wo und welcher Arm des Immunsystems angesprochen wird (Bolhassani *et al.*, 2011). DNA-Impfstoffe können z.B. als wässrige Lösung intramuskulär (i.m.), subkutan (s.c.), intranasal (i.n.) oder intravenös (i.v.) verabreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die orale Applikation der Vakzine mittels attenuierter Bakterien (Dietrich *et al.*, 1999; Darji *et al.*, 2000). Auf diesem Wege wird das mukosale Immunsystem des Darms angesprochen und durch die Fremdartigkeit der Bakterien eine zusätzliche Stimulierung des angeborenen Immunsystems erreicht (Gentschev *et al.*, 2002; Pawelek *et al.*, 2003; Holmgren and Czerkinsky, 2005). In dem Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe des Darmtraktes sind spezielle Zellen zur Aufnahme von Antigenen und Induktion spezifischer Effektor- und Gedächtniszellen vorhanden. Durch M-Zellen, eine Art spezialisierte Endothelzellen, wird die Passage partikulärer Antigene oder Mikroorganismen über das Schleimhautepithel in das darunterliegende Lymphgewebe ermöglicht, in dem

besonders konzentriert dendritische Zellen und Makrophagen zur Antigenaufnahme bereitstehen (Neutra and Kozlowski, 2006) (Abb. 1.6).

Bei den bakteriellen Applikationsvehikeln hat sich der Bakterienstamm *Salmonella typhimurium* bewährt (Darji *et al.*, 1997; Catic *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2013), der auch schon in eigenen Arbeiten erfolgreich eingesetzt wurde (Huebener *et al.*, 2003; Lode *et al.*, 2004; Huebener *et al.*, 2008; Fest *et al.*, 2009; Huebener *et al.*, 2009a). Alternative Carrier-Systeme in Form von Bakterien sind *Salmonella typhi*, *S. flexneri*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* und weitere (Gardlik and Fruehauf, 2010; Patyar *et al.*, 2010).



**Abb. 1.6: Weg zur Immunisierung bei oraler Applikation von DNA-Vakzinen *in vivo*.**

Die DNA-Vakzine werden den Mäusen oral mittels transformierten *S. typhimurium* SL7207 appliziert. So gelangen sie in den Gastrointestinaltrakt, wo sie durch die Darmmukosa penetrieren und über die M-Zellen in die Peyerschen Plaques gelangen. In diesen werden sie zusammen mit dem DNA-Vakzin von APC aufgenommen. Aufgrund einer Mutation des *Aro*-Gens (*Aro*-) in den Salmonellen SL7207 sind diese nicht in der Lage, sich zu vermehren und sterben daraufhin nach zwei Generationen *in vivo*. Nach dem Ableben werden die DNA-Vakzine freigesetzt, in den APC translatiert und schließlich durch das Proteasom degradiert. Die dadurch entstandenen Peptidfragmente von 8 bis 10 AS Länge werden dann im Endoplasmatischen Retikulum mit den MHC-Klasse-I-Molekülen verkoppelt, zusammen auf die Oberfläche der APC transportiert und dort präsentiert. Mit Hilfe der unmethylierten CpG-Inseln wird eine zusätzliche Stimulierung über den TLR-9 vermittelt und dies kann zur Aktivierung einer T-Zelle führen.

Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen sind bei der Prozessierung der Antigene von entscheidender Bedeutung. Diese Zellen, die sich in vielen Organen und Geweben, wie

der Haut und dem Intestinum, befinden, verbinden die Expression der Antigene mit denen der lymphatischen Organe. APC sind die einzigen Zellen mit der Fähigkeit, Antigene beider MHC-Klasse-Moleküle-I und -II restringent zu präsentieren und damit beide Seiten des Immunsystems zu induzieren (Harding and Unanue, 1990; Neefjes, 1996). Um die APC in dem Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe mit den DNA-Vakzinen zu erreichen, ist neben dem Applikationsvehikel auch die Wahl der zu präsentierenden Antigene und Vektoren entscheidend. Denn mit Hilfe von bestimmten Eigenschaften der Vektoren und der Antigene kann die Antigenpräsentation in MHC-Klasse-I-Molekülen auf APC gefördert werden.

### 1.10 Minigene

Epitope stellen die kleinste immunologische Einheit dar, mit Hilfe derer eine effektive Immunantwort hervorgerufen werden kann. Deswegen besteht auch die Möglichkeit, mit Hilfe ausgewählter Epitopsequenzen in Form von sogenannten Minigenen als DNA-Vakzine eine Immunantwort zu induzieren und diese für eine aktive Impfung einzusetzen. Minigene haben dabei einen entscheidenden Vorteil gegenüber Gesamt-DNA- und auch Peptid-Impfstoffen. In einem Minigen-Peptid können Epitope aus der AS-Sequenz eines TAA vereint werden, die eine hohe Affinität zu MHC-Klasse-I-Molekülen aufweisen, ohne dass ein funktionsfähiges Onko- bzw. Tumorsuppressorgen gebildet wird (Whitton, 1994). Obwohl das verwendete Peptid keine biologische Funktion ausübt, wird es degradiert und die ausgewählten Epitope werden präsentiert (Thomson *et al.*, 1998). Zudem kann durch die Auswahl mehrerer MHC-affiner Epitope eine multiple zytotoxische T-Zell-Antwort erzielt werden (An and Whitton, 1997; Hardwick and Chain, 2011).

Beim Design der Minigene sollte beachtet werden, dass nach der Degradierung durch das Proteasom möglichst Peptide entstehen, von denen der C-Terminus eine hohe Affinität zu TAP und MHC-Klasse-I-Molekülen aufweist (siehe Abschnitt 1.8) (Ossendorp *et al.*, 1996). Da das Proteasom bevorzugt nach basischen und hydrophoben Resten schneidet, kann durch „kleine“ Aminosäuren wie Glycin und Alanin die C-terminale Degradierung gefördert werden.

Der C-Terminus ist aber nicht alleine für die Effizienz der Degradierung und Präsentation verantwortlich, sondern auch die Aminosäuren, welche die Epitop-Sequenz N-Terminal flankieren oder sich innerhalb des Epitops befinden (Kraft *et al.*, 1998; Beekman *et al.*, 2000). Durch eine *Spacer*-Sequenz aus Alanin-Alanin-Tyrosin, kann eine Degradierung durch das Proteasom an eben diesen Stellen provoziert werden (Holzhutter *et al.*, 1999; Velders *et al.*, 2001).

Der N-Terminus eines Epitops wird unabhängig vom Proteasom gebildet. Verschiedene Aminopeptidasen, die die Vorläuferpeptide auf die richtige Länge schneiden, bewerkstelligen das N-terminale *Trimming* (siehe Abschnitt 1.6.) (Neefjes *et al.*, 1993; van Endert *et al.*, 1995). Spezielle Aminosäuren, die eine Verbesserung der Prozessierung bewirken, sind nicht bekannt; die Affinität zu den MHC-Bindungstaschen scheint maßgeblich zu sein.

### **1.11 Das NXS2- und C1300-NB-Mausmodell**

Um die Effektivität und Wirksamkeit *MYCN*-spezifischer Immuntherapien zu untersuchen, bedarf es immunkompetente, *MYCN*-überexprimierende NB-Mausmodelle, welche idealerweise einen ähnlichen Verlauf bei der Tumorentwicklung und Metastasenbildung aufweisen wie es bei NB-Patienten zu beobachten ist.

Zwei in unserem Labor etablierte immunkompetente Mausmodelle sind die NB-Zelllinien C1300 und NXS2, die syngen in immunkompetenten A/J-Mäusen wachsen.

Durch i.v.-Injektion von C1300-Zellen kann eine Metastasenbildung in unterschiedlichen Organen, wie Nieren, Lymphknoten, Ovarien und Leber, induziert werden. Diese GD<sub>2</sub>-negative Neuroblastomzelllinie, die von A/J-Mäusen abstammt, wurde mit GD<sub>2</sub>-positiven Grenzstrang-Ganglionzellen fusioniert. Dabei entstand die Hybridzelllinie NXS2 mit einer heterogenen aber stabilen GD<sub>2</sub>-Expression (Lode *et al.*, 1997b).

Subkutan injizierten NXS2-Zellen zeigen in A/J-Mäusen, nach chirurgischer Intervention des Primärtumors, eine spontane Metastasierung wie sie auch bei NB-Patienten auftritt. So sind Metastasen in Organen und Geweben zu finden, die typisch für das menschliche Neuroblastom sind, wie z.B. dem Knochenmark, der Leber, den Lymphknoten, Nebennieren und Ovarien.

Da beide Zelllinien nur eine geringe (NXS2) bzw. nahezu keine (C1300) *MYCN*-Expression aufweisen, sind sie nur bedingt für die Untersuchung *MYCN*-basierter Vakzine geeignet. Weil sie aber bereits bei der Etablierung anderer DNA-Vakzine erfolgreich zur Anwendung kamen, wurden sie auch zur Untersuchung der in dieser Arbeit hergestellte Vakzine verwendet (Lode *et al.*, 2004; Huebener *et al.*, 2008; Fest *et al.*, 2009).

### **1.12 Zielsetzung**

Das Neuroblastom zählt nach wie vor zu den therapieresistentesten Tumoren des Kleinkindalters. Gerade NB mit *MYCN*-Amplifikation sind stets mit einer schlechten Prognose assoziiert, wobei die von den Rezidiven entwickelte Chemotherapie-Resistenz häufig die größte Herausforderung darstellt.

Die Entwicklung einer spezifischen aktiven Immuntherapie gegen das Selbstantigen *MYCN* könnte einen vielversprechenden alternativen therapeutischen Ansatz zur Behandlung dieses Tumors darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit war somit die Herstellung von DNA-Vakzinen auf Basis des tumorassoziierten-Antigens *MYCN* und die Untersuchung ihre Wirksamkeit *in vivo*.

Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand die Frage, ob mit Hilfe der *MYCN*-Vakzine eine aktive, *MYCN*-spezifische, CTL-vermittelte Immunantwort gegen *MYCN*-exprimierende Tumoren in Mäusen induziert werden kann.

Dabei sollte mit Hilfe von Minigen-Vakzinen analysiert werden, ob mit ausgewählten, hochaffinen CD8 T-Zell-Epitopen aus der Aminosäuresequenz von MycN, eine ebenso effektive Immunisierung erreicht werden kann, wie durch eine gesamt *MYCN*-cDNA-Vakzine. Als orales Applikationsvehikel wurden attenuierte *Salmonella typhimurium* verwendet, die zum Durchbrechen der Selbsttoleranz dienen sollten.

Des Weiteren mussten für die Untersuchungen der Vakzine *in vivo*, die murinen, zu immunkompetenten A/J-Mäusen syngeneten Zelllinien, NXS2 und C1300 stabil mit einem induzierbaren *MYCN*-Expressionsvektorsystem transfiziert werden. Nach Auswahl und Etablierung geeigneter *MYCN*-exprimierender Transfektanten sollten die DNA-Vakzine hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen *MYCN*-exprimierenden Neuroblastome in den neuen Mausmodellen untersucht werden. Ferner sollte im Anschluss der *in-vivo*-Versuche, mit Hilfe von Splenozyten aus geimpften Mäusen, die *MYCN*-Spezifität der Immunantwort in *ex-vivo*-Assays genauer charakterisiert werden.

## 2. Material

### 2.1 Reagenzien

Alle Reagenzien bzw. Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Bio-Rad Fluka, Merck, Sigma, Roche, oder Roth in Analyse-Qualität bezogen.

### 2.2 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Einwegskalpelle	PFM, Köln
Kunststoffküvetten, Halb-Mikro	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Mikrokulturplatten	Nunc, Wiesbaden Biebrich
Nitrocellulose 0,45 µm	Amersham Buchler, Braunschweig
Objektträger, Polylysin-beschichtet	Menzel, Braunschweig
Parafilm	American National, USA
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Polyethylen-Röhrchen (15 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 -2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, PCR	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsplatten, PCR, optisch, 96-Well	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Transformationsküvetten, Spaltweite 0,1 cm	Eppendorf, Hamburg
Whatman 3MM Papier	Whatman International, LTD, GB
Zellkulturschalen	Falcon, Franklin Lakes, USA
Zellsiebe, 70 µm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

### 2.3 Laborgeräte

Automatische Pipetten	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Middleton, GB
StepOnePlus™ Real-Time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Geldokumentationssystem Geldoc	Bio-Rad, München
MACS-Separations-System	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop DM RA 2	Leica, Hamburg
Mikrotom RM2125	Leica, Hamburg
Mini-Protean I+ II System	Bio-Rad, München



PCR-Heizblock GeneAmp 9600	Perkin-Elmer, Weiterstadt
Photometer	Bio-Rad, München
Schüttelinkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific, Offenbach
Schüttler IKA KS250	Janke & Kunkel, Staufen
Taumelroller	Janke & Kunkel, Staufen

## Zentrifugen

GP-Centrifuge	Beckman Instr., München
J-6 M/E Centrifuge	Beckman Instr., München
JS 2-21 M/E Centrifuge	Beckman Instr., München

## 2.4 Enzyme

DNA-Polymerase I	MBI-Fermentas, St.Leon-Rot
DNase I / RNase frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Reverse Transkriptase	Invitrogen, München
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RNase / DNase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, München
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

## 2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme und Lösungen

SuperSignal® West Dura Chemiluminescence Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
MACS-Select System	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Plasmid Kits (Mini, Midi, Maxi)	Macherey-Nagel, Düren
Gel Extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren
IFN- $\gamma$ ELISA-Kit	Roche, Mannheim
Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren
RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren
Endofree Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
TRIZOL™ Reagent	Invitrogen-Life Technologies, Karlsruhe
TaqMan®Fast Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

## Transfektionsreagenzien

Effectene™ Transfektionsreagenz

Qiagen, Hilden

Metafectene™ Transfektionsreagenz

Biontex GmbH, München

FuGENE®6 *Transfection Reagent*

Roche, Mannheim

## 2.6 Verwendete Antikörper

Primärantikörper		
Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Anti-hp53-PE	Anti-human p53 Antikörper, PE konjugiert, polyklonal aus Kaninchen	Merck, Darmstadt
Anti-mCDK4-FITC	Anti-murin CDK4 Antikörper, FITC konjugiert, polyklonal aus Kaninchen	Dianova, Hamburg
Anti-MYCN (C901)	Anti-murin MYCN Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Cell-Signalling, Mannheim
Anti-mMycN (M50)	Anti-murin MYCN Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-mMycN (2)	Anti-murin MYCN Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-N-Myc (B8.48B)	Anti-MycN (human und murin) Antikörper, monoklonal aus Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p21 (C-19)	Anti-p21 Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Ha-Tag	Anti-Ha-Tag Antikörper, monoklonal aus Maus	Cell-Signalling, Mannheim
Anti-GD2 (CH14.18)	Anti-human GD2 Antikörper, chimärer (murin/human), monoklonaler Antikörper	Eigene Herstellung
Anti-GD2 (14G2A)	Anti-murin GD2 Antikörper, chimärer (murin/human), monoklonaler Antikörper	Eigene Herstellung
Anti-p53 (M50)	Anti-muriner p53 Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-CDK4-PE (SC-4)	Anti-CDK4 (human/murin) Antikörper, PE konjugiert, monoklonal aus Maus	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-MDM2 (M53)	Anti-MDM2 Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-β-Aktin-PE	Anti-β-Aktin Ak PE konjugiert, monoklonal aus Maus	Sigma, München

Sekundärantikörper		
Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Anti-Ziege-FITC	FITC konjugierter anti-Ziege Antikörper, monoklonal aus Maus	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Cy-3	Cy-3 konjugierter anti-Maus Antikörper, polyklonal aus Schaf	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen Cy-5	Cy-5 konjugierter anti-Kaninchen Antikörper, polyklonal aus Affe	Dianova, Hamburg
Anti-human-PE	PE-konjugierter anti-human Antikörper, monoklonal aus Maus	Sigma, München
Anti-Maus-FITC	FITC konjugierter anti-Maus Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-PE	PE konjugierter anti-Maus Antikörper, polyklonal aus Kaninchen	Bio-Rad, München
Anti-Kaninchen-PE	PE konjugierter anti-Kaninchen Antikörper, polyklonal aus Ziege	Bio-Rad, München

## 2.7 Antibiotika

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe
Doxycyclin	Sigma, München
G418 Sulfate	Sigma, München
Hygromycin B	Sigma, München
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	PAA, Heidelberg
Tetracyclin	Sigma, München
Zeocin <sup>™</sup>	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.8 Plasmide

Expressionsplasmide		
Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
pGem-T-Easy	Klonierungs-und Expressionsvektor Ampicillin-Resistenz	Promega, Mannheim
pSecTag 4.1	Expressionsvektor Ampicillin-Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pCDV2-mMYCN	Expressionsvektor Ampicillin-Resistenz	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Wechsler-Reya, Duke University Medical Center, NC, USA

Plasmide des T-REx™ Expressionssystems von Invitrogen		
Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
pcDNA 4.0/TR®	Expressionsvektor mit vorgeschaltetem Tetracyclin-Induzierbarem Promotor, Zeocin™ Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 6/TR®	regulatorischer Vektor, exprimiert den Repressor, Blastidin Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 4.0/TR®-LUC	Expressionsvektor mit vorgeschaltetem Tetracyclin-Induzierbarem Promotor mit Luciferase-Gen, Zeocin™ Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe

Plasmide für die DNA-Vakzine		
pCMV-F3Ub	Expressionsplasmid mit vorgeschaltetem Ubiquitin - führt zur Expression eines ubiquitinierten Fusionspeptids Ampicillin-Resistenz	freundlicherweise bereitgestellt von JL Whitton, Scripps Research Institute in La Jolla, USA
Mini-mMYCN-High pCMV-F3Ub	aus mMycN-Sequenz ermittelte CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Epitope mit stärkster theoret. Bindungsaffinität zu MHC-Klasse-I im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit
Mini-mMYCN-Low pCMV-F3Ub	aus mMycN-Sequenz ermittelte CD8 <sup>+</sup> T-Zell - Epitope mit geringster theoret. Bindungsaffinität zu MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit
Mini-hMYCN-High pCMV-F3Ub	aus hMycN-Sequenz ermittelte CD8 <sup>+</sup> T-Zell - Epitope mit stärkster theoret. Bindungsaffinität zu MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit
Mini-hMYCN-Low pCMV-F3Ub	aus hMycN-Sequenz ermittelte CD8 <sup>+</sup> T-Zell - Epitope mit geringster theoret. Bindungsaffinität zu MHC-Klasse I im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit
cDNA-mMYCN pCMV-F3Ub	cDNA von mMycN im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit
cDNA-hMYCN pCMV-F3Ub	cDNA von hMycN im pCMV-F3Ub-Vektor	Vorliegende Arbeit

Klone mit integrierten Plasmiden		
Bezeichnung	Beschreibung Plasmid	Bezugsquelle
NXS2-MYCN-1	T-REx™ Expressionsplasmid pcDNA 4.0/TR® mit muriner MYCN cDNA und <i>in frame</i> ligiertem HA-Tag	Vorliegende Arbeit
NXS2-MYCN-2	T-REx™ Expressionsplasmid pcDNA 4.0/TR® mit muriner MYCN cDNA	Vorliegende Arbeit
C1300-MYCN-A	T-REx™ Expressionsplasmid pcDNA 4.0/TR® mit muriner MYCN cDNA und <i>in frame</i> ligiertem HA-Tag	Vorliegende Arbeit
C1300-MYCN-B®	T-REx™ Expressionsplasmid pcDNA 4.0/TR® mit muriner MYCN cDNA	Vorliegende Arbeit

## 2.9 Größenstandards

### 2.9.1 DNA-Marker

1 kb, 100 bp DNA-Ladder

Invitrogen, Karlsruhe

1 kb, 500/200/50 bp DNA-Ladder

MBI-Fermentas, St.Leon-Rot

### 2.9.2 Protein-Marker

Multi-Color®, Multi-Range®, Broad-Range®

MBI-Fermentas, St.Leon-Rot

MagicXP®, Dual Color®

Bio-Rad, München

## 2.10 Puffer und Lösungen

### 2.10.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

#### Agarosegele

0,5-2% (w/v) Agarose

1 x TAE-Puffer

#### 1 x PBS

50 mM NaCl

10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

#### Ethidiumbromid

Stammlösung: 10 µg/ml in H<sub>2</sub>O

Für Gele: 5 µl Stammlösung/100 ml

#### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA

#### TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, pH 7,4

5 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

#### TBST-Puffer

1 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

0,2% Tween 20

### 2.10.2 Immunfluoreszenz

#### Fixierlösung

3,7% Formaldehyd in 1 x PBS

#### DAPCO-Lösung

0,23 g DAPCO in 800 µl H<sub>2</sub>O

200 µl 1 M Tris, pH 8

9 ml Glycerin

**Permeabilisierungslösung**

0,1% BSA  
0,05% NP40 in 1 x PBS

**DAPI-Stammlösung**

0,25 mg/ml in H<sub>2</sub>O

**2.10.3 Western Blot****Trenngel**

8-12% Acrylamid  
1% Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 0,1% SDS, pH 8,8)  
0,2% TEMED (Bio-Rad)  
0,06% APS

**Elektrophoresepuffer**

0,025 M Tris  
0,192 M Glycin  
0,1% SDS

**Sammelgel**

4% Acrylamid  
1% Sammelgelpuffer (1 M Tris, pH 6,8)  
0,2% TEMED  
0,5% APS

**Transferpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20% Methanol

**Laemmli-Puffer**

100 mM Tris-HCl pH 6,8  
4% SDS  
0,2% Bromphenolblau  
20% Glycerin  
200 mM DTT

**2.11 Bakterienmedien**

SOC-Medium

Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium/LB-Agar

Roth, Arlesheim, CH

Antibiotika wurden nach Abkühlen des Mediums auf 50°C in folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Zeocin <sup>™</sup>	50 µg/ml

## 2.12 Zellkulturmedien und Zusätze

Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden als Fertigprodukte bezogen.

DMEM	PAA, Mannheim
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Mannheim
Fötale Kälberserum Tetracyclin negativ (FKS-tet)	PAA, Mannheim
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Mannheim
RPMI1640 (inklusive 4 mM L-Glutamin)	PAA, Mannheim
Trypsin 0,05%	PAA, Mannheim
Trypsin 0,25%	PAA, Mannheim

## 2.13 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstämme		
Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> JM109	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>lacX74</i> <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>nupG</i> <i>rpsLA</i> -	Invitrogen-Life Technologies, Karlsruhe
<i>S. typhimurium</i>	2337–65 derivativ <i>hisG</i> 46, DEL407 [ <i>aroA</i> ::Tn10(Tc-s)]	Dr. B. A. D. Stocker, Stanford, CA, USA

## 2.14 Verwendete Zelllinien

Gewebekulturzellen		
Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Kelly	humane Neuroblastom-Zelllinie mit amplifiziertem <i>MYCN</i> -Gen	(Schwab <i>et al.</i> , 1983)
Tet21N	SH-EP Abkömmling, mit transgenem Tetracyclin induzierbaren <i>MYCN</i> (Neo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> )	(Lutz <i>et al.</i> , 1996)
HEK293	Humane embryonale Nierentumor-Zelllinie	(Graham <i>et al.</i> , 1977)
SCK	Murine Mamma-Karzinom-Zelllinie aus A/J Mäusen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Chang W. Song, University of Minnesota
NXS2	Murine Neuroblastom-Zelllinie mit syngenen Charakter zu A/J Mäusen. Entstanden aus einer Fusion von Gangliosidzellen und C1300 Zellen	(Lode <i>et al.</i> , 1997b)
C1300	Murine Neuroblastom-Zelllinie mit syngenen Charakter zu A/J Mäusen	keine Daten gefunden
Neuro2A	Murine Neuroblastom-Zelllinie mit syngenen Charakter zu A/J Mäusen	(Olmsted <i>et al.</i> , 1970)
COS7	Primaten Nieren-Fibroblasten-Zelllinie	Keine Daten gefunden

### **3. Methoden**

#### **3.1 Standardmethoden**

Molekularbiologische Standardmethoden wie enzymatische Reaktionen, Anzuchten von Bakterien und PCRs wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den jeweiligen Standard-Protokollen durchgeführt.

#### **3.2 Molekularbiologische Methoden**

##### **3.2.1 Transformation kompetenter JM109-*E.coli*-Bakterien**

50 µl einer Suspension kompetenter JM109-*E.coli*-Bakterien wurden mit 10-25 ng Plasmid-DNA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 90 sec in 42 °C warmes Wasser gegeben und anschließend mit 200 µl 37 °C warmem SOC-Medium versetzt. Nach 60 minütiger Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttler wurde 100 µl der Suspension auf LB-Ampicillin (LB-Amp) -Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten einzelne Bakterienkolonien gepickt werden.

##### **3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979).

Je nach Ansatz wurden die JM109-*E.coli*-Bakterien über Nacht bei 37 °C in einem den Ansatz entsprechenden Volumen selektivem LB-Medium angezogen. Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Kit II von Macherey und Nagel. Mit den Plasmid Midi- oder Maxi-Kit des gleichen Herstellers wurden Plasmid-Präparationen in größerem Maßstab vorgenommen. Alle Schritte wurden nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

##### **3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Zellen und Tumoren**

Für die Isolierung genomischer DNA (gDNA) aus Zellen bzw. Tumoren wurde das *Tissue*-Kit der Firma Macherey und Nagel verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Isolierung der gDNA wurden 10<sup>7</sup> Zellen verwendet. Die isolierte gDNA wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.



### 3.2.4 Ethanolfällung

Um DNA von Verunreinigungen wie z.B. hohen Salzkonzentrationen, freien Nukleotiden und Proteinen zu befreien, um sie z.B. zum Sequenzieren zu schicken, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde wässrige DNA-Lösung mit dem 0,1-fachen Volumen 3 M NaAc und dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt. Nach Vortexen des Ansatzes wurde dieser für 30 min bei -80 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C und 13.000 *rpm* zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel-Extraktions-Kit II von Macherey und Nagel und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Reinigung bzw. Entfernung von Enzymen und Nukleotiden nach PCRs, Auffüllreaktionen, Restriktionen und Ligationen folgte anschließend eine Ethanolfällung.

### 3.2.6 Restriktionen

DNA wird sequenzspezifisch durch Restriktionsendonukleasen des Typs II gespalten. Bei der Restriktion entstehen, je nach verwendetem Enzym, 3'- oder 5'-Überhänge (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen und nach Angaben des Herstellers angewendet. Es war darauf zu achten, dass der Glyzerinanteil in den Ansätzen der Restriktion 5% nicht überschreitet, da dies die Aktivität des Enzyms negativ beeinträchtigen kann.

### 3.2.7 Transformation von *S. typhimurium* SL 7207 durch Elektroporation

Für die orale Applikation von DNA-Vakzinen wurden elektrokompente, attenuierte Salmonellen des Stammes *Salmonella typhimurium* SL7207 als Vehikel verwendet, die zuvor mit den entsprechenden DNA-Plasmiden transformiert werden mussten. Zunächst wurden elektrokompente Salmonellen wie folgt hergestellt: Die Salmonellen wurden über Nacht in 3 ml LB-Medium ohne Selektionsdruck inkubiert und am folgenden Tag in 200 ml LB-Medium überführt. Dieser Ansatz wurde für weitere 2-4h bei 37 °C inkubiert und dann 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien bei 4500 *rpm* und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl eiskaltem H<sub>2</sub>O gelöst,

auf vier 50-ml-Falcons verteilt und erneut mit jeweils 40 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Bakterien in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, in Aliquots a 40 µl aufgeteilt und im Verhältnis 1 zu 1 mit 10%igem Glycerin vermischt. Bis zur Verwendung wurden sie bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurde jeweils ein Aliquot 10 min auf Eis aufgetaut, mit ca. 400 ng Vakzin-DNA vermischt und für weitere 20 min inkubiert. Die gekühlten Ansätze wurden dann in eine vorgekühlte Küvette überführt, in einen Elektroporator gegeben und transformiert (anliegende Spannung 2 kV, Impulsdauer 5 ms). Direkt nach der Pulsauslösung wurden die Proben mit 600 µl vorgewärmtem SOC-Medium vermischt, in 1,5 ml Eppies überführt und für 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 50 µl der Ansätze wurden auf Selektions-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.2.8 Ligationen**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in ein linearisiertes Plasmid wurde im Fall von hybridisierten Oligonukleotiden ein 240facher molarer Überschuss, im Fall von einem größeren DNA-Fragment ein dreifacher molarer Überschuss an DNA im Vergleich zum Plasmid gewählt. Die Ligationsansätze bestehend aus Plasmid, DNA, Ligasepuffer und Ligase, wurden 16 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Ligationsansatz:      100 ng linearisiertes Plasmid (ca. 0,025 pmol)  
                              x ng DNA-Fragment  
                              0,5 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)  
                              0,5 µl T4 DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs)  
                              ad 5 µl ddH<sub>2</sub>O

### **3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten wurden 1-3%ige (w/v) Agarosegele gegossen. Für die Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und auf ca. 50 °C abgekühlt. Dann wurden 2 µl EtBr-Stammlösung zugegeben und die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen. Nach der Polymerisierung wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer mit TAE-Puffer gegeben und die Proben aufgetragen. Diese wurden für 20-60 min bei ~110 V aufgetrennt und bei 302 nm mit einer *Eagle-Eye*-Apparatur von Bio-Rad analysiert.

### 3.2.10 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Mit Hilfe von PCR können definierte Fragmente einer geringen DNA-Ausgangsmenge (*template*) *in vitro* amplifiziert oder ausgewählte DNA-Fragmente aus Plasmiden amplifiziert werden. Je nach Verwendungszweck und Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments erfolgten die Reaktionen mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen.

#### **Standard-PCR**

Standard-PCR-Ansätze, etwa zur Überprüfung von Klonierungen, wurden mit der hitzestabilen Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* in 20-50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Die Ansätze enthielten:

10-100 ng DNA  
10 pmol forward-Primer  
10 pmol reverse-Primer  
je 0,2 mM dNTP Mix  
1/10 Vol. Taq-Polymerase-10x-Puffer  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1-2 Units Taq-Polymerase

Zur Amplifikation wurden die Ansätze initial für 1-3 min bei 95 °C denaturiert und dann in 25-35 Zyklen folgenden Reaktionsschritten unterzogen:

Denaturierung:	95 °C	10-50 sec
Annealing:	55-65 °C	30-60 sec (abhängig vom Primer)
Elongation:	65-75 °C	30 sec-5 min (abhängig von der Länge des Zielfragments)

Eine abschließende Elongation wurde für 2-5 min bei 65-75 °C (Standard mit Taq-Polymerase: 72 °C) durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze auf 4 °C heruntergekühlt.

#### **Überlappende-PCR**

Für die überlappende-PCR, die für die Herstellung der Minigen-Expressionskassetten verwendet wurde, wurden Primer (Oligonukleotide), die über eine Länge von 20-30 Nukleotiden komplementär zu einander waren, verwendet. Während der PCR binden die komplementären Bereiche aneinander und werden durch die verwendete Polymerase

komplementiert. Die nicht übereinstimmenden Bereiche kodieren für die restlichen Minigensequenzen, so dass nach der PCR ein vollständiges Minigen entsteht. Für diese PCR wurde eine *Pfu*-Polymerase verwendet, die eine *proof-reading*-Funktion besitzt und eine hohe Genauigkeit der Zielsequenz gewährleistet.

Die Annealingtemperatur der jeweiligen Oligonukleotide wurde den Herstellerangaben entnommen.

**PCR-Programm:**

92 °C 3 min

92 °C 15 s

60 °C 30 s Gradient +/- 5 °C

72 °C 1 min 30 s

Zyklen: 30

72 °C 7 min

4 °C ∞

Die 50-µl-Ansätze für eine solche-PCR sahen folgendermaßen aus:

5 µl sense-Primer

5 µl antisense-Primer

5 µl 10xPCR-Puffer

3 µl MgCl<sub>2</sub>, 25mM

1 µl dNTP-Mix, 10 mM

30 µl ddH<sub>2</sub>O

1 µl Taq-Polymerase

Bei einer PCR, die mit einer *Pfu*-Polymerase durchgeführt wurde, bilden sich an den 5'-Enden der entstehenden DNA-Fragmente keine A-Überhänge wie bei einer PCR mit *Taq*-Polymerasen. Diese können zur Klonierung in TA-Vektoren wie pGEM-T-Easy genutzt werden. Deshalb wurde mit der DNA, die aus PCRs mit *proof-reading* Funktion gewonnen wurde, abschließend ein *A-Tailing* durchgeführt. Dafür wurde das PCR-Produkt für 10 min mit einer *Taq*-Polymerase und passendem Puffer bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt und konnte dann direkt für Klonierungen verwendet werden.

### 3.3 Herstellung der DNA-Vakzine

#### 3.3.1 Generierung der Minigene

Für die Herstellung der Minigene mussten zunächst geeignete Epitope aus der Gesamtprotein-Sequenz des jeweiligen Antigens ermittelt werden. Dieses erfolgte anhand berechneter *scores*, die einen relativen Wert für die Bindungsaffinität von Epitopen zu MHC-Molekülen repräsentieren. Die Berechnung dieser *scores* basiert auf bereits veröffentlichten Motiven von natürlichen MHC-Liganden, unter Berücksichtigung bevorzugter AS an bestimmten Positionen der Bindungsstelle im MHC-Molekül. Jeder Aminosäure eines Epitops wird dabei ein bestimmter Wert zugeordnet, je nachdem wie häufig diese in den jeweiligen Positionen bei natürlichen MHC-Liganden gefunden wurde. Je besser die Aminosäure in eine Position passt, umso höher ist der angegebene *score*. Bei einer perfekten Bindung beträgt der Wert 15, bei einer schlechten 0. In Abhängigkeit der jeweiligen MHC-Moleküle unterscheiden sich die Maximalwerte für die jeweiligen Liganden. Anhand dieser *scores* wurden schließlich die Epitope ausgewählt, die für die später hergestellten Minigene verwendet wurden (Abschnitt 4.1). Bei der Auswahl wurde auf die MHC-Liganden-Datenbank *syfpeithi* zurückgegriffen. Mit dieser war es möglich, die Epitope aus der Gesamtprotein-Sequenz von MycN zu ermitteln, die die theoretisch höchste bzw. niedrigste Affinität zu H2-K<sup>k</sup>, dem MHC Klasse-I-Allel der A/J-Maus, aufweisen (Rammensee *et al.*, 1999).

Für die weitere Herstellung der Minigene wurden die in Abschnitt 1.10 genannten Rahmenbedingungen berücksichtigt. So wurden die hergestellten Epitope mittels *Spacer*-Sequenzen, bestehend aus AAY, miteinander ligiert und für die spätere Ligation in den Expressionsvektor pCMV-F3Ub (siehe Abschnitt 3.3.2) mit einer spezifischen *Bgl*II-Schnittstelle versehen. Um die Expression der Fragmente im Western-Blot nachweisen zu können, wurde am C-Terminus ein MYC- oder HA-Tag angefügt (Abb. 3.1).

#### Peptid-Sequenz:

*Bgl*II-AAY-EDAPPQKKI-AAY-EEEIDVVTV-AAY-SERRRNHNI-AAY-EQKLISEEDL-Stop-*Eco*RI-*Bgl*II

#### DNA-Sequenz (168bp):

AGATCTTC-GCCGCCTAC-GAGGATGCGCCTCCACAAAAGAAAATC-GCCGCCTAC-GAGGAAGAAATAGATGTAGTGACAGTT-GCCGCCTAC

*Bgl*II IF Spacer EDAPPQKKI – Epitop Spacer EEEIDVVTV - Epitop Spacer

AGTGAACGAAGAAGGAACCATAATATA-GCTGCTTAT-GAACAAAATTGATAAGTGAGGAAGATTTA-TAG-GAATTCAGATCT

SERRRNHNI- Epitop Spacer Myc-Tag Stop *Eco*RI *Bgl*II

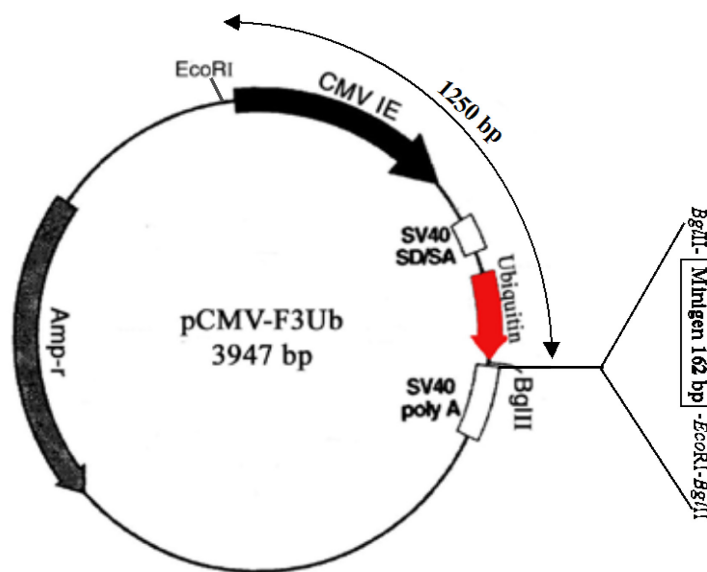
**Abb. 3.1: Exemplarischer Aufbau eines in dieser Arbeit verwendeten Minigenes.**

*Kursiv:* Restriktionsschnittstellen; Schwarz: *spacer*-Peptid; Stop: Ende der Translation; rot: H2-K<sup>k</sup>-Epitope; blau: Myc-Tag

### 3.3.2 Das Expressionsplasmid pCMV-F3Ub

Die hergestellten Minigene wurden anschließend in das Expressionsplasmid pCMV-F3Ub ligiert (Abb. 3.2). Dieses Plasmid eignet sich besonders für eine aktive Immuntherapie mit DNA-Vakzinen, da es neben der natürlichen Stimulierung des Immunsystems durch unmethylierte CpG-Inseln die Expression eines ubiquitinierten Fusionspeptids, durch ein vor der *multiple cloning side* (MCS) geschaltetes Ubiquitin-Gen (Ub), ermöglicht.

Durch das Ub wird die Degradierung des exprimierten Peptids/Proteins durch die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Proteolyse gefördert (siehe Abschnitt 1.8). Im Wildtyp-Ub wird durch einen Protease-Komplex die poly-Ub-Kette nach jedem Gly<sub>76</sub> geschnitten und als Ub Monomere entlassen (*recycling*). Zur Stabilisierung des Fusionspeptids wurde die C-terminale Aminosäure (AS) Gly<sub>76</sub> des Ubiquitins gegen die AS Ala<sub>76</sub> getauscht (Rodriguez *et al.*, 1999). Dies führt zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Fusionspeptids, verbessert die Degradierung der Epitope durch das Proteasom und verstärkt die Bildung von den Zielpeptiden entsprechenden MHC-Klasse-I-Liganden (Ecker *et al.*, 1989).



**Abb. 3.2: Der eukaryotische Expressionsvektor pCMV-F3Ub.**

Die Abbildung zeigt das Expressionsplasmid pCMV-F3Ub. Zu sehen ist das vor der *BglII*-Schnittstelle gelegene Ubiquitin. Exemplarisch wird ein Minigen an der Ligationsstelle gezeigt. Die Schnittstelle *EcoRI* ist sowohl im Plasmid als auch im Minigen vorhanden. So kann eine korrekte Ligation nachgewiesen werden.

### 3.4 RNA-Analyse-Techniken

#### 3.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde zum einen das RNA-Isolierungskit RNA II von Macherey und Nagel oder TRIZOL™ von Invitrogen verwendet. Die Isolierungen wurden nach Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

Die isolierte RNA wurde in einem äquivalenten Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### 3.4.2 Reverse Transkription

Um die Expression bestimmter mRNAs im Agarose-Gel nachzuweisen und zur Vorbereitung der *Real-Time*-quantitativen-PCR (q-PCR) wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt. Dabei wird die aus Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die RT wurde nach folgendem Protokoll von Invitrogen durchgeführt:

- 1 µl RNA (mit ddH<sub>2</sub>O auf 4 µl auffüllen)
- 2 µl Hexanucleotide
- 1 µl dNTP's
- 6 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden 5 min bei 65 °C inkubiert, dann für 3 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit folgenden Substanzen aufgefüllt:

- 1 µl DTT (0,1 M)
- 4 µl 1st Strand Puffer
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 1 µl RNase Inhibitor

Die Ansätze wurden gevortext und wie folgt inkubiert:

- |        |       |
|--------|-------|
| 5 min  | 25 °C |
| 60 min | 50 °C |
| 15 min | 70 °C |

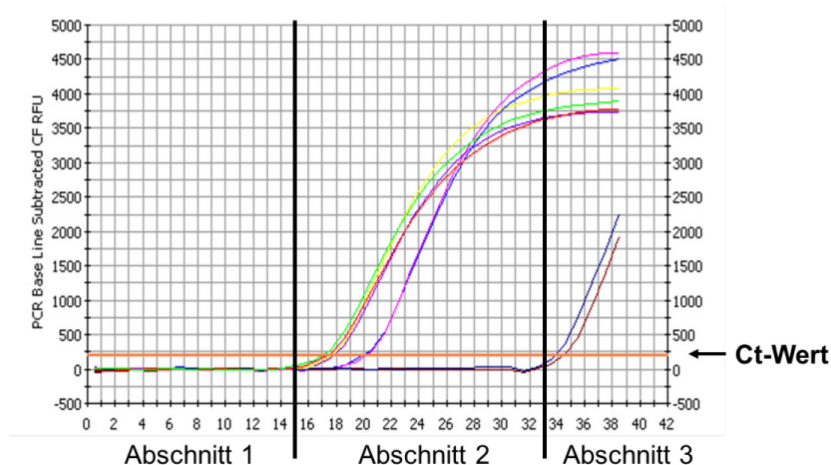
Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverwendet.

### 3.4.3 Real-Time-quantitative-PCR (q-PCR)

Bei der q-PCR wird die Vervielfältigung eines DNA-Produkts während der Amplifikation in einer PCR durch Fluoreszenzmessung direkt gemessen. Für die Fluoreszenzmarkierung werden dabei zum einen Hydrolysierungssonden, sogenannte Quencher, oder doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR Green, verwendet.

Ein Quencher (Taqman-Sonde) besteht aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, welches sequenzspezifisch DNA-Fragmente bindet. Bei jeder Vervielfältigung werden die Quencher durch die 5'-Exonuclease-Aktivität der verwendeten Polymerase hydrolysiert. Bei der noch intakten Sonde wird die Fluoreszenz des Fluorochroms am 5'-Ende der Sonde (Reporter) von dem Fluorochrom 3'-Ende (Quencher) durch Energieübertragung (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) unterdrückt.

Die Hydrolysierung führt zu einer Verringerung des Abstands der Fluorochrome und dadurch zu einer erhöhten Fluoreszenz des Reporters. Sie nimmt proportional zur Anzahl der vorhandenen Amplikons zu. Bei einer SYBR Green q-PCR wird anstelle eines Quenchers ein fluoreszierender Farbstoff eingesetzt, der mit doppelsträngiger DNA einen Komplex eingeht, der charakteristisch fluoresziert. Dadurch kann, wie bei Verwendung eines Quenchers, die Zunahme von PCR-Produkten in „Echtzeit“ gemessen werden. Dabei stellt bei beiden Systemen der Anstieg der Fluoreszenz das Maß der Produktvermehrung dar. Die entstehende Fluoreszenz wird mittels *eines qReal-Time-PCR-Systems* gemessen und kann mit einer PC-Software graphisch dargestellt werden (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Graphisches Beispiel für das Ergebnis einer q-PCR.**

Gezeigt wird ein exemplarischer Verlauf einer q-PCR. Die PCR ist in drei Abschnitte unterteilt: 1. Stagnierende Phase, 2. Exponentieller Phase, 3. Plateauphase. Für die Bestimmung der relativen Expression eines Gens ist der Ct-Wert entscheidend. Dieser Wert beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen, bei der die exponentielle Phase mit einer konstanten Steigung erreicht wurde.



Die dabei entstehenden Kurven zeigen drei Abschnitte: Zu Beginn ist das Hintergrundsignal des Systems größer als das Signal des eingesetzten Fluorochroms. Sobald genug PCR-Produkt in Form von doppelsträngiger DNA gebildet bzw. Sonden hydrolysiert wurden, beginnt eine exponentielle Phase mit einer konstanten Zunahme der Fluoreszenz. Sie endet mit einer Plateauphase zum Ende der Reaktion.

Zur Bestimmung der Genexpression unterschiedlicher Gene wird auf der x-Achse die Anzahl der PCR-Zyklen und auf der y-Achse die relative Zunahme der Fluoreszenz im Laufe der PCR dargestellt. Für die genaue Quantifizierung wird von jeder Kurve der sogenannte *crossing-point* (Ct) ermittelt. Dieser ist definiert als die Anzahl von PCR-Zyklen, bei der die Fluoreszenz, die freigesetzt wird, einen festgesetzten Wert überschreitet. Dieser Wert muss oberhalb der Grundlinie und im Bereich des konstanten exponentiellen Anstiegs der Kurven liegen. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge der doppelsträngigen DNA.

Da die Effizienz der Amplifikation von Versuch zu Versuch unterschiedlich sein kann, wurde zur Normalisierung der Genexpression bei jedem Versuch parallel ein Referenzgen gemessen; in dieser Arbeit wurde dabei 18s-RNA oder GAPDH verwendet. Anhand der Referenzgene konnten die Ergebnisse der untersuchten Gene normalisiert und ein Einfluss durch Menge und Qualität der eingesetzten cDNA weitestgehend kompensiert werden. Alle q-PCRs wurden zur Auswertung dreimal wiederholt und alle Proben mindestens als Triplets gemessen.

Aus den ermittelten Werten wurde schließlich die Genexpression anhand folgender Gleichung bestimmt:

$$X = 2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)}$$

Dabei stellt  $\Delta Ct1$  die Differenz des Ct-Wertes der Referenz cDNA und des Ct-Wertes für den internen Standard dar.  $\Delta Ct2$  ist die Differenz des Ct-Wertes der zu bestimmenden cDNA und des Ct -Wertes für den internen Standard dieser cDNA.

Für die q-PCR wurden stets Mastermixe hergestellt.

Ein 20- $\mu$ l-Ansatz für eine q-PCR mit TaqMan-Sonde sah wie folgt aus:

- 1  $\mu$ l sense-Primer (100 nm)
- 1  $\mu$ l antisense-Primer (100 nm)
- 1  $\mu$ l TaqMan-Sonde (10 nm)
- 10  $\mu$ l TaqMan® Gene Expression MX (BD)
- 7  $\mu$ l Probe (isolierte RNA 1:10 verdünnt)

Ein 20-µl-Ansatz für eine q-PCR mit SYBR Green sah wie folgt aus:

0,5 µl sense-Primer (50 nm)  
0,5 µl antisense-Primer (50 nm)  
10 µl Fast SYBR Green Master Mix (AB)  
7 µl H<sub>2</sub>O  
2 µl Probe

Für die *MYCN*-q-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

PCR-Programm:

95 °C 5 min

95 °C 15 s

60 °C 30 s

Zyklen: 40

### **3.5 Zellkulturmethoden**

#### **3.5.1 Kultivierung von Zelllinien**

Alle verwendeten Medien und Zusätze wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von der Firma PAA Laboratories bezogen. Die Kulturbedingungen für Zellen waren stets 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

Die Kultivierung der für die stabile Transfektion und in den *in-vivo*-Versuchen eingesetzten Neuroblastomzelllinien wt-NXS2, wt-C1300 und Transfektanten erfolgte in DMEM *High Glucose* mit 10% Mycoplex FKS (später auch Tet freies FKS) und 1% Penicillin-Streptomycin. Beim Splitten der Zellen wurden diese 5 min lang mit 0,05% Trypsin inkubiert, welches durch Zugabe von frischem Medium inaktiviert wurde. Für die Tumorzellapplikation wurden die jeweiligen Zellen in PBS ohne Zusätze aufgenommen.

Für die am Ende eines *in-vivo*-Versuches durchgeführten Zytotoxizitätsversuche wurden aus den Milzen der Mäuse Splenozyten isoliert und in T-Zell-Medium (RPMI1640, 10% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 IU/ml IL-2) *in vitro* für 5-6 Tage kultiviert.

Für die Überexpression von Plasmid-DNA im eukaryotischen System wurden die adhärennten Nierenzelllinien COS7 und HEK293 eingesetzt, sie benötigten ebenfalls DMEM High Glucose Medium mit 10% Mycoplex FKS und 1% Penicillin-Streptomycin.

Für die virale Transduktion wurde die Verpackungszelllinie HEK293T verwendet. Die Kultivierung erfolgte analog zu HEK293-Zellen.

Die Mamma-Karzinom-Zelllinie SCK stammt aus A/J-Mäusen und wurde als Zielzelllinie in Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Diese adhärenenten Zellen wurden in RPMI1640 mit 10% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden sie mit 0,25%igem Trypsin 3 min inkubiert.

Die humanen Neuroblastomzelllinien Tet21N, Kelly, SK-N-SH und Lan-1 wurden ebenfalls in RPMI1640 mit 10% FKS, 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert.

Für alle durchgeführten Versuche wurden nur Zellen mit einer maximalen Kulturdauer von drei Monaten (etwa 20 Passagen) verwendet.

### **3.5.2 Kryokonservierung von Zelllinien**

Zur Lagerung wurden Zellen in Einfriermedium (je nach Zellen RPMI/ DMEM High Glucose, 20% Mycoplex FKS, 5% DMSO) aufgenommen und zunächst bei -20 °C und anschließend bei -80 °C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.5.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE™6**

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Es gibt unterschiedliche Substanzen, die als Träger für die DNA dienen können, wie z.B. kationische Liposomen oder Calciumphosphat. Bei dem Transfektionsreagenz Fugene™6 werden kationische Lipide als Träger verwendet. Diese bilden mit der DNA einen Komplex, wodurch die DNA durch Poren in die Zellen transfizieren kann. Das Transfektionsreagenz Metafectene®Pro, welches ebenfalls in einigen Ansätzen verwendet wurde, beruht auf kationischen Liposomen, die wie auch bei Fugene die DNA umhüllen und einen Transport durch Poren der Zellmembranen ermöglicht.

Die jeweiligen Transfektionen wurden nach Angaben der Hersteller und mit den dort genannten Konzentrationen durchgeführt.

### **3.5.4 Herstellung stabiler Zellklone**

Bei der Herstellung stabiler Zellklone mit linearisierten Plasmiden soll das gesamte Plasmid mit Promotor, Transgen und Antibiotikaresistenz in das Genom der Zielzelle integriert werden. Anders als bei einer viralen Transduktion, wird dabei die DNA zufällig während der

Zellteilung ins Genom integriert. Bei einer transienten Transfektion wird ein zirkuläres Plasmid verwendet, das extrachromosomal in der Zelle vorliegt. Zur Herstellung stabiler Zellklone wurden die Zellen jedoch mit einem linearisierten Plasmid transfiziert. Damit sollte die Aufnahme des Plasmids in das Genom der Zelle vereinfacht werden. Zudem wurde so verhindert, dass der bei der Integration entstehende Bruchpunkt im Plasmid, da er nur linear eingebaut werden kann, nicht im Promotor, im Antibiotikaresistenzgen oder in dem kodierenden Bereich des *gene of interest* (GOI) liegt. Vor der Transfektion wurden die verwendeten Plasmide (pCDNA6 und pCDNA4.0/TO, siehe Abschnitt 3.5.5) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert, aufgereinigt und anschließend mit Hilfe von FuGENE<sup>TM</sup>6 oder Metafectene<sup>®</sup>Pro in die Zellen transfiziert. Drei Tage nach den Transfektionen wurde mit einer Antibiotika-Selektion begonnen.

Nach der Selektion wurden die verbliebenen Zellen geerntet und ausgezählt. Um Einzelzellklone zu generieren wurden sie so stark verdünnt, dass in 100 µl Medium rechnerisch nur noch 0,2 Zellen enthalten waren, die in einer 96-Well-Platte ausgesät wurden (100 µl je Well).

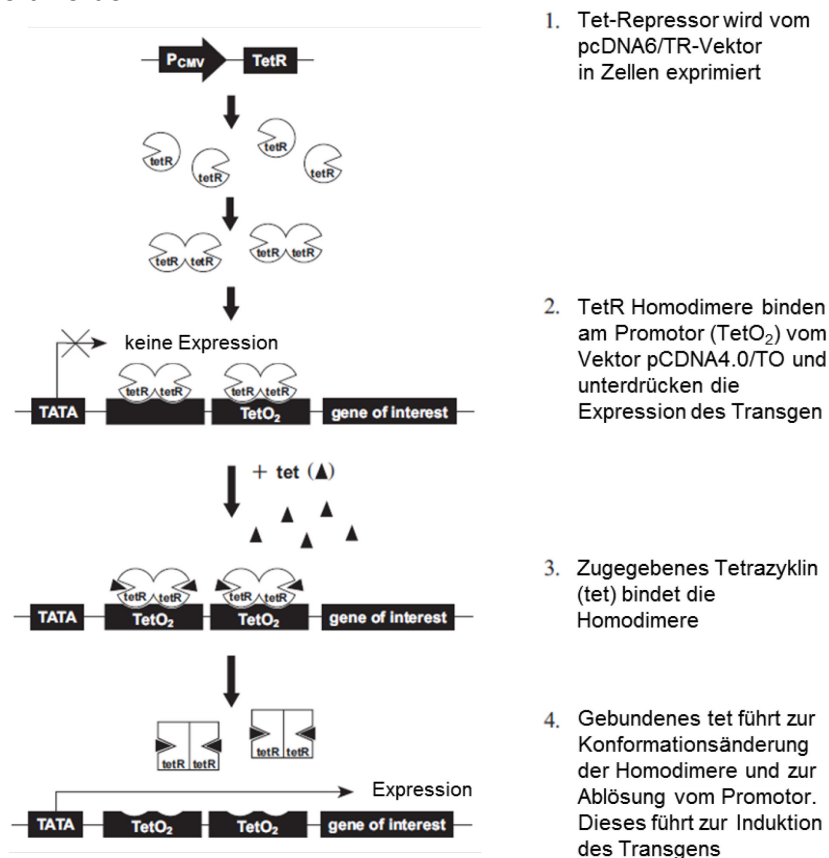
### 3.5.5 Tetracyclin-induzierbare Vektorsysteme

Schon in den frühen 90er Jahren wurden Zellen aus Vektorsystemen etabliert, die eine gezielte Expression von Genen zuließen (Burcin *et al.*, 1998). Diese induzierbaren Vektorsysteme ermöglichten eine über Derivate der Tetracyclin-Familie regulierbare Expression von gewünschten Genen innerhalb stabil transfizierter Zellen. Damit konnten Genexpressionsstudien von Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen mit Zelllinien durchgeführt werden, indem die Expression entsprechender Gene gezielt induziert bzw. gehemmt wurde (Gossen and Bujard, 2002). Ein weiterer Vorteil der Induzierbarkeit ist die Möglichkeit Zellen mit Genen zu transfizieren, die bei erhöhter Expression zum Zelltod führen und eine Expansion der Zellen unmöglich machen würde. Im Verlauf der Zeit wurden die Vektorsysteme soweit optimiert, dass integrierte Transgene nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* zur konditionalen Expression stimuliert werden konnten. Seitdem fanden diese Systeme auch immer häufigere Anwendung in transgenen Mäusen (Kistner *et al.*, 1996; Gossen and Bujard, 2002; Zhu *et al.*, 2002).

Kommerziell erhältlich sind Tet-on- und Tet-off-Systeme, die durch Zugabe von Tetracyclin-Derivaten wie Doxycyclin, die Expression eines gewünschten Transgens induzieren (Tet-on) oder blockieren (Tet-off). Da eine Überexpression von *MYCN* zu einer Apoptose-Sensibilisierung von Zellen führen kann, wurde in dieser Arbeit auf ein System zurückgegriffen, welches eine gezielte Induktion des Zielgens zulässt. Dieses System sollte eine hohe Expression bei Induktion und eine geringe oder fehlende basale Expression des

Zielgens aufweisen. Zudem musste der Induktor hochselektiv und nebenwirkungsfrei sein. Diesen Ansprüchen wird das Tet-regulierbare Expressionssystem T-REx™ von Invitrogen gerecht. Dieses System besteht aus zwei regulatorischen Einheiten: eine ist der regulatorische Vektor pcDNA6/TR® welcher einen hohen Level des TetR-Repressors exprimiert (Postle *et al.*, 1984). Die zweite Einheit ist der Vektor pCDNA4.0/TO, der einen Tet-responsive Promotor ( $P_{CMV}$ ) vor der *multiple cloning side* (MCS) geschaltet hat (Abb. 3.5). Die Regulation des Transgens erfolgt in diesem System mit dem Tetracyclin-Derivat Doxycyclin. Dabei wird durch Zugabe von Doxycyclin die Transkription des gewünschten Gens angeschaltet (Tet-on). Voraussetzung für eine induzierbare Genexpression ist das Vorhandensein beider Vektoren in einer Zelle, wobei eine ausreichende Menge des TetR-Moleküls von entscheidender Bedeutung ist. Durch Zugabe von Tet oder eines seiner Derivate, die in einem Verhältnis von 1:1 an die Repressormoleküle binden, kommt es zu einer Konformationsänderung, die zur Ablösung des TetR von der TetO<sub>2</sub>-Sequenz führt. Dadurch kommt es zur Expression des gewünschten Zielgens.

Dieses System ist für Säugerzellen ausgelegt und eignet sich auch für *in-vivo*-Versuche. Durch Zugabe von Doxycyclin und Saccharose (unterbindet den bitteren Geschmack von Doxycyclin) im Trinkwasser oder Futter der Tiere kann die Expression des Zielgens in den Tieren reguliert werden.



**Abb. 3.5: Funktion des T-REx™-Systems.**

In der hier gezeigten Abbildung ist die Funktion der unterschiedlichen Bestandteile des T-REx™-Systems unter den Punkten 1-4 aufgeführt (Abbildung modifiziert aus der Produktbeschreibung von Invitrogen).

### 3.5.6 Dual-Luciferase®-Reporter-Assay

Nach der stabilen Transfektion der Zellen mit dem für das Repressormolekül kodierenden Vektor pcDNA6/TR wurde mit Hilfe des Reporter-Vektors pcDNA 4/TO-Luc, welcher für das Luciferase-Gen (*Firefly*) kodiert, die Induzierbarkeit der stabil transfizierten Zellen untersucht. Als Kontrolle diente der Vektor pRL-TK, der für das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Renilla reniformis* kodiert. Durch die Messung der Luciferase Aktivität des Reporter-Plasmids im Verhältnis zum Kontrollplasmid kann die Induktionsstärke bzw. die Effektivität des Repressormoleküls bestimmt werden, da durch das Molekül der Promotor des Reporter-Plasmids blockiert und die Expression der *Firefly*-Luciferase unterbunden wird. Anhand der Differenz zwischen den beiden verwendeten Luciferasen kann dann die Effektivität des Repressormoleküls ermittelt werden.

Für die Untersuchung wurden  $1 \times 10^4$  stabil transfizierte Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und transient mit dem Reporter-Plasmid pcDNA 4/TO-Luc transfiziert. Anschließend wurden die Proben 24-48h mit oder ohne Doxycyclin inkubiert. Danach erfolgte die Untersuchung mit dem *Dual-Luciferase®-Reporter-Assay* der Firma Promega, mit dem gleichzeitig die Lumineszenz der *Firefly*- und die der später zugebenen *Renilla*-Luciferase gemessen werden kann. Der Assay wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 250 µl PLB (*passiv lysis buffer*) lysiert, 10 min bei RT inkubiert und für 60 min bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 20 µl der Zelllysate auf eine neue 96-Well-Platte überführt und mit 100 µl der Luciferin-Substratlösung vermischt. Sofort nach Zugabe des Substrates wurde die Luciferase-Aktivität in Form von *Relative-Light-Units* (RLU) in einem Luminometer in Abständen von 10 sec gemessen. Abschließend wurde den Ansätzen 100 µl *Stop- and Glo*-Puffer zugefügt. Dadurch wurde die *Firefly*-Luciferase gehemmt und die *Renilla*-Luciferase aktiviert, deren Lumineszenz dann detektiert wurde. Anhand der ermittelten RLUs wurde nun die Aktivität der Luciferasen berechnet und daraus die Induzierbarkeit der jeweiligen Transfektanten bestimmt.

### 3.5.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder FACS (*fluorescence activated cell sorting*) dient der Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Einzelzellen. Dabei werden Zellen in einem aus Flüssigkeit bestehenden Hüllstrom an einem Laser vorbeigeführt. Von den Zellen werden Photonen abgelenkt, die mit einem Kollektor aufgefangen und an einem PC ausgewertet werden können. Mit diesem Streulicht können Analysen zur Granularität, Zellgröße und DNA-Gehalt durchgeführt werden.

Durch Färbungen mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern können aber auch Oberflächenmarker bzw. -Proteine sowie intrazelluläre Bestandteile, wie z.B. Zytokine und Chemokine, analysiert werden. Durch die Verwendung mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern kann sogar eine gleichzeitige Analyse vieler Faktoren durchgeführt werden. Dabei wird das Licht einer bestimmten Wellenlänge durch das jeweilige Fluorochrom unterschiedlich emittiert. Das emittierte Licht wird ebenfalls von einem Kollektor aufgefangen und an einen PC weitergeleitet, der die Signale differenziert und darstellt.

Bei allen FACS-Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst trypsiniert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer (PBS+1% BSA + 0,1% EDTA + 0,1% NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Nach jedem Waschen wurden die Zellen für 5 min bei 300 *rpm* pelletiert.

Die jeweiligen Färbungen mit den Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurden anschließend nach Standardprotokollen auf Eis durchgeführt.

### **3.5.8 CFSE-Färbung**

Mit einer Carboxyfluoreszein-Succinimidyl-Ester-Färbung (CFSE) kann mit Hilfe eines FACS-Gerätes die Teilung und somit das relative Wachstum von Zellen bestimmt werden. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) beladen. Hierbei handelt es sich um einen Zellmembran-gängigen Farbstoff, der an freie Amine von zytoplasmatischen Proteinen bindet. Wird das CFDA-SE von den Zellen aufgenommen, werden durch intrazelluläre Esterasen zwei Azetatgruppen vom CFDA-SE abgespalten und diese führen zur Umwandlung in den fluoreszierenden Farbstoff CFSE. Dieser kann Zellmembranen nicht passieren und verbleibt lange Zeit im Zytoplasma. Da CFSE bei einer Zellteilung mit hoher Genauigkeit zu 50% auf die Tochterzelle weitergegeben wird, kann anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität das Wachstum der Zellen ermittelt werden.

Für die Färbung der zu untersuchenden Zellen wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen dreimal mit Waschpuffer (PBS/0,1% BSA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M CFSD-SE in einem Volumen von 500  $\mu$ l Medium (ohne Zusätze) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum „quenchen“ des Farbstoffes wurden die Zellen dann für 5 min auf Eis gestellt und schließlich zweimal mit frischem Medium (10% FKS, 1% P/S) gewaschen und in Kultur genommen.

Zum Ermitteln des spontanen Verlustes an CFSE wurde jeweils ein Ansatz mit Mitomycin C blockiert und mitgeführt. Mitomycin C interkaliert mit der Doppelhelix der DNA, wodurch die DNA-Stränge kovalent gebunden werden und sich nicht mehr trennen können. Dieses führt schließlich zum Zellzyklusarrest. Für die Blockierung wurden  $5 \times 10^5$  CFSE-gefärbte Zellen mit 50  $\mu$ g/ml Mitomycin in einem Gesamt-Volumen von 500  $\mu$ l PBS 20 min bei 37 °C

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und wieder in Kultur genommen.

Die Messung der CFSE-Abnahme in den jeweiligen Zellen wurde an den Tagen 1-3 an einem Durchflusszytometer bestimmt. Anhand der Abnahme des geometrischen Mittels der CFSE-Fluoreszenz wurde die prozentuale Veränderung zum jeweiligen Vortag und daraus die Proliferation der Zellen berechnet.

Für die Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Ansätze jeweils dreimal durchgeführt. Bei dem ersten Ansatz wurden die Zielzellen an einem Tag gefärbt und an unterschiedlichen Tagen gemessen. Um Schwankungen durch die Messung am FACS-Gerät zu berücksichtigen, wurde das gleiche Experiment mit CFSE-Färbungen der Zielzellen an den Tagen 1-3 durchgeführt und alle Proben an Tag 3 gemessen.

Die Ergebnisse aller Versuche wurden schließlich gemittelt und daraus die Abnahmen des geometrischen Mittels der Fluoreszenz zum jeweiligen Vortag bestimmt.

### **3.6 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.6.1 Extraktion von Proteinen aus Zellen**

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden die Zellen mit Trypsin von den Kulturschalen abgelöst, in einen 15-ml-Falcon überführt und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen Ripa-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 14.000 *rpm* und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend verworfen und der Überstand in ein neues *Tube* überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.6.2 SDS-PAGE und Western-Blot**

Unter denaturierenden Bedingungen können Proteine in Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gele) ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch in den Probenpuffern und im Gel befindliches Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich unabhängig von der Aminosäuresequenz an Proteine anlagert, ist die Polarität der Proteine durch geladene Aminosäurereste unerheblich. Die negative Ummantelung der Proteine durch SDS führt zu einer einheitlichen Laufrichtung der Proteine in Richtung Anode. Für die Proteinauftrennung wurden Minigele nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) hergestellt. Je nach gewünschter Auflösungsgröße der Gele wurden für die Trenngele PAA-Konzentrationen von 7,5-12,5% gewählt. Beim Sammelgel wurde eine Konzentration von 4% verwendet.

Für die Elektrophoresen wurden die Proteinproben zur Denaturierung mit 1 Volumen Laemmli-Puffer versetzt, 5-10 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die



Elektrophoresen wurden bei konstanter Spannung von 120 V für 60-120 min im Mini-Protean® II-System (Bio-Rad) durchgeführt. Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das Gel für einen Western-Blot vorbereitet.

Beim Western-Blot werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch ein elektrophoretisches Verfahren auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran überführt. Für das Blotten wurde ein *Wet-Blot* nach Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Der Transfer erfolgte bei 90 V für 60 min. Anschließend wurde die Membran mit Blockierlösung (Rotiblock, Roth) für eine Stunde bei RT geblockt. Primärantikörper wurden in einer Konzentration von 1-10 µg/ml gelöst, in Blockingpuffer gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem 10 minütigem Waschen mit Waschlösung (TBS+0,5% Tween 20) und einmaligem Waschen mit einfach TBS wurde die Membran in TBS aufgenommen und mit 1-10 µg/ml des Sekundärantikörpers für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem VersaDoc 4000 von Bio-Rad.

### **3.6.3 Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die zu untersuchenden Zellen auf silanierte Objektträger ausgesät und mit Medium überschichtet. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Medium gewaschen und für 10 min mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen 10 min mit einer Permeabilisierungslösung behandelt, um zytoplasmatische und nukleäre Proteine für die Antikörper zugänglich zu machen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min folgte eine Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper für 1h. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Pro Objektträger wurden 5 ng verdünnter Antikörper (in 1 x PBS mit 0,1% BSA) aufgetropft und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach zweistündiger Inkubation im Dunkeln wurden die Deckgläschen mit PBS abgespült und dreimal gewaschen. Anschließend wurden die Präparate auf dem Objektträger mit VersaMount® abgedeckt.

Die Auswertung und Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem Leica DM RA 2 Mikroskop. Die Präparate konnten in Dunkelheit bei 4 °C einige Tage gelagert werden.

### **3.7 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.7.1 Mäuse**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten *in-vivo*-Versuche wurden mit syngeneten weiblichen A/J-Mäusen durchgeführt, die im Alter von 6-8 Wochen und einem Mindestgewicht von 20 g von Harlan-Winkelmann bezogen wurden. Die Unterbringung der Tiere erfolgte im SPF (spezifisch Pathogen-freien) -Bereich der tierexperimentellen Einrichtung. Vor den jeweiligen Experimenten wurden die Mäuse in Gruppen aufgeteilt, durch Ohrlöcher markiert und das Körpergewicht bestimmt. Für die Experimente mit subkutaner Tumorapplikation wurden die Tiere im Bereich der linken Flanke mit einem Rasierer rasiert. Während des Versuchs operierte Mäuse wurden für zwei Tage mit einem Analgetikum zur eventuellen Schmerzlinderung behandelt.

#### **3.7.2 Orale Impfung von Mäusen**

Für die oralen Impfversuche der A/J-Mäuse wurden die jeweiligen Salmonellen über Nacht bei 37 °C in 50 ml LB-Selektions-Medium angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden diese für 10 min bei 3000 *rpm* pelletiert und das entstandene Pellet wurde zweimal mit  $\text{tapH}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe eines Photometers bei 600 nm bestimmt. Dabei entsprach  $\text{OD}_{600} = 0,1 = 1 \times 10^8$  Salmonellen/ml. Aus den berechneten Konzentrationen wurden Suspensionen mit  $5 \times 10^8$  Bakterienzellen/100  $\mu\text{l}$  in  $\text{tapH}_2\text{O}$  hergestellt. Die orale Applikation der Salmonellen ( $5 \times 10^8/100 \mu\text{l}$  Salmonellen pro Maus) erfolgte mit einer speziellen Magensonde für Mäuse.

#### **3.7.3 Subkutane Applikation der Tumorzellen**

Das NXS2-Neuroblastom-Mausmodell bietet aufgrund der hohen Aggressivität des Tumors ein stetig gleichbleibendes Krankheitsbild, in dessen Verlauf mehrere Möglichkeiten bestehen, die Anti-Tumorantwort der Vakzine zu untersuchen (Abschnitt 1.11). Dazu gehört der Einfluss auf das Primärtumorstadium, der durch Messen des Tumorstadiums bestimmt werden kann. Zusätzlich können die Tumorgewichte nach operativer Entfernung ermittelt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Modells besteht darin, den Effekt auf spontane Metastasierungen im weiteren Versuchsverlauf zu untersuchen. Dafür wird am Versuchsende der Metastasierungsgrad unterschiedlicher Organe, wie z.B. Nieren, Leber und Ovarien ermittelt, also Organe die besonders von NXS2-Zellen infiltriert werden. Dabei

wird wie folgt eingestuft: Keine Metastasen 0% = 0, <20% Metastasierung = 1, 20-50% Metastasierung = 2, >50% Metastasierung = 3.

Für die subkutane Applikation der Tumorzellen in die Mäuse wurden die verwendeten Zellen trypsinisiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$ /100  $\mu$ l in Medium ohne Zusätze aufgenommen. Je 100  $\mu$ l wurden dann den Mäusen subkutan unter die Haut injiziert. Nach ca. 4-5 Tagen Wachstum wurden die Tumoren messbar. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Tumorgroße alle zwei Tage mit einer Schieblehre gemessen und die Volumen nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{1}{2} \times \text{Länge [mm]} \times \text{Breite}^2 \text{ [mm}^2\text{]}$$

Bei einem Tumolvolumen von 1500 mm<sup>3</sup> wurden die Tumoren durch eine chirurgische Intervention entfernt und das Gewicht bestimmt.

### **3.7.4 Chirurgische Intervention bei Versuchsmäusen**

Für die Narkose wurden den Mäusen je nach Körpergewicht pro Gramm 10  $\mu$ l einer Xylazin/Ketamin-Mischung intraperitoneal injiziert. Die Richtwerte für die Injektion entsprachen bei einem durchschnittlichen Körpergewicht einer Maus von 20-25 g 16-20  $\mu$ g Xylazin und 80-100  $\mu$ g Ketamin pro Gramm Körpergewicht. Die Narkose trat nach etwa fünf Minuten ein und dauerte ca. 30-60 min. Bei dem Eingriff wurden die Mäuse auf dem Rücken auf einer Wärmedecke liegend operiert. Nach großflächiger Desinfektion der Bauchseite mit 70% EtOH wurde der subkutan gewachsene Tumor vom darunterliegenden Bauchfell gelöst und mit einer Schere herausgeschnitten. Nach Entfernung des Tumors wurde dieser gewogen und für immunhistologische Färbungen in Einbettmedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Formalin fixiert.

Die Wunde wurde mit Wundklammern verschlossen und den Tieren 100  $\mu$ l eines Analgetikums zur Schmerzlinderung in das Nackenfell injiziert (Flunixin). Die Heilung der Wunden wurde im weiteren Verlauf kontrolliert. Zehn Tage nach der OP wurden die Wundklammern entfernt.

### **3.7.5 Beendigung eines Mausexperiments**

Je nach Versuchsverlauf konnten in den operierten Mäusen nach ca. 3-7 Wochen spontane Metastasen in sekundären lymphatischen Organen, Leber, Knochenmark, Nieren, Lunge, und den Ovarien festgestellt werden. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens getötet und das Experiment beendet. Für weitere

Untersuchungen wurden zunächst die Milzen entfernt und hieraus die Splenozyten isoliert. Des Weiteren wurden die metastasierten Organe entfernt, das Gewicht bestimmt und einzelne Metastasen ausgezählt. Für weitere Untersuchungen wurden die Organe in Formalin eingebettet.

### **3.8 Immunologische Methoden**

#### **3.8.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus lymphatischen Organen**

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die aus den Mäusen präparierten Milzen wurden auf Zellsiebe, die mit komplettem DMEM-Medium überdeckt waren, gegeben und mit dem Stempel einer Spritze durch das Sieb gedrückt. Die erhaltene Suspension wurde erneut über das Zellsieb in einen 50-ml-Falcon überführt und mit etwas RPMI-Medium (10% FKS, 1% P/S) abgespült. Pro Milz wurden etwa 5 ml Medium eingesetzt. Die gewonnenen PBMCs wurden pelletiert, der Überstand verworfen und eine ACK-Lyse zur Entfernung der roten Blutkörperchen durchgeführt. Dafür wurden die Splenozyten pro Milz mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer vermengt, geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in kompletten RPMI resuspendiert. Zur Entfernung von toten Zellen konnte eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen im Medium mit Ficoll unterschichtet und für 20 min bei 300 g zentrifugiert (ohne Bremse). Die vitalen Lymphozyten befanden sich anschließend in der Interphase und konnten vorsichtig herausisoliert und zweimal mit kompletten RPMI gewaschen werden. Die Lymphozyten wurden in T-Zell-Medium aufgenommen und mit einer Konzentration von  $5-10 \times 10^7$  Zellen/10 ml in 250-ml-Zellkulturflaschen ( $75 \text{ cm}^3$ ) überführt.

#### **3.8.2 Messung der Aktivität isolierter Lymphozyten mittels IFN- $\gamma$ -ELISA**

Die isolierten Lymphozyten wurden in dieser Arbeit auf ihre spezifische Aktivität mit Hilfe eines IFN- $\gamma$ -ELISA analysiert. Dabei wird das von Lymphozyten sekretierte IFN- $\gamma$  nach unterschiedlichen spezifischen und unspezifischen Stimulationen bestimmt. Je nach freigesetzter IFN- $\gamma$ -Menge kann je nach Stimulierung die Spezifität der Lymphozyten nachgewiesen werden.

Für den Versuch wurden  $1 \times 10^6$  Splenozyten in 6-Well-Platten mit 3 ml T-Zell-Medium ausplattiert. Dann wurden für die unspezifische Stimulierung 100 IU IL-2/ml, 50 IU IL-2/ml oder Concanavalin A (ConA) (5  $\mu\text{g/ml}$ ) zur Bestimmung des Maximal-Release zugegeben. Für die spezifische Stimulierung wurden  $1 \times 10^4$  durch Bestrahlung (30Gy) inaktivierte wt-

NXS2/C1300 oder inaktivierte C1300-MYCN-A bzw. NXS2-MYCN-1 zu den Splenozyten gegeben. Anschließend wurden je nach Versuch bis über einen Zeitraum von 6 Tagen 200 µl Medium entnommen und zentrifugiert, um enthaltene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde schließlich in einem IFN-γ-ELISA von Roche (*mouse* Interferon-γ-ELISA-Kit) untersucht.

### 3.8.3 Messung der zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten

Um die Effektivität der induzierten CD8<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten, anti-tumoralen Immunantwort der eingesetzten DNA-Vakzine zu testen, wurden mit den isolierten Lymphozyten Chrom(Cr)51-Release- oder LDH-Assays durchgeführt.

#### Chrom(CR)51-Release-Assay

Beim Chrom(Cr)51-Release-Assay werden die Zielzellen (T) (*target cells*) mit <sup>51</sup>Cr beladen. Diese wurden in 96-Well-Platten ausplattiert und mit isolierten Lymphozyten als Effektorzellen (E) in verschiedenen Verhältnissen überschichtet und für 4 oder 8h inkubiert. Durch den nach Lyse der Zielzellen freigesetzten Anteil von <sup>51</sup>Cr in den Überstand (*Release*) kann mit Hilfe eines γ-Szintillationszählers die Menge des ausgetretenen <sup>51</sup>Cr quantifiziert werden. Durch Bestimmung des Maximal- (vollständig lysierte Zellen) und des Spontan-*Releases* lässt sich mit der folgenden Formel die prozentuale Effektivität der Effektorzellen quantifizieren.

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{experimentelle Freisetzung [cpm]} - \text{spontane Freisetzung [cpm]}}{\text{maximale Freisetzung [cpm]} - \text{spontane Freisetzung [cpm]}} \times 100$$

Für den Versuch wurden 2x 10<sup>6</sup> Zellen/1,5 ml in ein 15-ml-Röhrchen überführt und mit 0,5 mCi <sup>51</sup>Cr vermischt. Die Proben wurden für 2h bei 37 °C inkubiert und alle 30 min geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze dreimal gewaschen und in 2 ml frischem Medium aufgenommen, um eine Konzentration von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erreichen. Dann wurden 5x 10<sup>3</sup> beladene Zielzellen in 100 µl Medium auf einer 96-Well-Platte ausplattiert und Effektorzellen, ebenfalls in 100 µl aufgenommen, in unterschiedlichen Verhältnissen (*effector:target ratio* = ET-Verhältnis) zugegeben.

Für die Bestimmung des Spontan- und des Maximal-*Releases* (Zugabe von 10 µl 10%iger SDS-Lösung) wurden einige *Wells* nur mit Ziel- oder Effektorzellen beladen. Schließlich wurden die Zellen für 4 oder 8h inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Überstand abgenommen und die Radioaktivität der einzelnen Proben bestimmt.

### **Laktatdehydrogenase (LDH)-Assay**

Der LDH-Assay beruht auf der Messung der Plasmamembranpermeabilität durch Bestimmung der freigesetzten Laktatdehydrogenase in den Zellüberstand. LDH ist ein zytoplasmatisches Protein und ubiquitär in allen Zellen verteilt. Durch das Enzym wird der letzte Schritt der anaeroben Glykolyse katalysiert. Wird eine Zelle durch äußerliche oder andere Faktoren geschädigt bzw. lysiert, können Enzyme wie LDH in den Zellüberstand entweichen und die Aktivität kann dann photometrisch über die Umsetzung von Nikotin-Adenin-Dinukleotid (NAD) bestimmt werden, welche durch die Umsetzung von Pyruvat und NADH+H zu Lactat und NAD<sup>+</sup> zustande kommt.

Der Assay wurde mit einem Kit von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Untersuchung wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Zielzellen/Loch mit 100 µl Medium ausgesät. Auf diese wurden unterschiedliche Konzentrationen Effektorzellen gegeben. Wie auch beim *Chrome-Release-Assay* wurde der Spontan- und Maximal-Release bestimmt. Nach Inkubationszeiten von 4 oder 8h wurde 50 µl Überstand abgenommen und die LDH-Aktivität bestimmt. Die prozentuale Lyse-Aktivität konnte nach der gleichen Formel wie beim *Chrom-Release-Assay* bestimmt werden.

### **3.8.4 Pulsen von SCK-Zellen mit exogenen Peptiden**

Bei SCK handelt es sich um eine Mamma-Karzinom-Zelllinie, welche keine *MYCN*-Antigene exprimiert. Diese Zelllinie ist, wie die NB-Zelllinien NXS2 und C1300, syngen zu A/J-Mäusen und exprimiert das MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> auf der Zelloberfläche. Diese Zelllinie wurde als Zielzelle in Zytotoxizitätsassays zum Nachweis *MYCN*-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach einem Vakzinierungsversuch mit pMDV1 und MYCN<sup>Low</sup> eingesetzt. Um die Spezifität der Lymphozyten nachzuweisen, mussten die Zellen zunächst mit den drei MycN-Epitopen für die pMDV1 kodiert beladen werden.

Für das sogenannte *pulsen*, also exogene Peptide in MHC-Klasse-I-Moleküle gewünschter Zellen zu präsentieren, wird die spontane Anlagerung von im Überschuss vorliegenden und zu MHC-Klasse-I-Molekülen hoch affinen Peptiden ausgenutzt (Kubitscheck *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1999). Bei ausreichender Konzentration und/oder besonders starken Bindungsaffinitäten kommt es teilweise zu kompetitiven Bindungen bereits beladener MHC-Klasse-I-Moleküle.

Für das Beladen wurden  $2 \times 10^6$  SCK-Zellen in komplettem RPMI über Nacht mit den drei MycN-Epitop-Peptiden EDAPPQKKI, EEEIDVVTV und SERRRNHNI in einer Konzentration von 0,1 µg/ml inkubiert. Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Zellen dreimal mit frischem Medium gewaschen und danach ausplattiert.

### **3.9 Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten**

Alle verwendeten Lösungen und Chemikalien wurden, sofern nicht anderweitig beschrieben, von Sigma-Aldrich oder Roche bezogen.

#### **3.9.1 Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung von Paraffinschnitten**

Für histologische Untersuchungen von Tumoren und Organen nach Versuchsende wurden diese aus den Mäusen präpariert und in Formalin fixiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten sie bei RT gelagert werden.

Für die Herstellung der Gewebeschnitte wurden Materialschnitte in einer Entwässerungskammer über eine aufsteigende Konzentrationsreihe von EtOH (70-100%) entwässert und mittels einer Paraffin-Einbettungsmaschine in Paraffin eingebettet. Die paraffinierten Gewebeproben wurden in 1-3 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf silanisierten Objektträgern ausgelegt. Die nun folgenden Schritte wurden in Glasküvetten unter Verwendung von Objektträgerhaltern durchgeführt. Für die H/E-Färbung wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit Xylen entparaffiniert und mittels einer absteigenden EtOH-Reihe gewaschen (zweimal für 8 min in absolutem EtOH, zweimal für 6 min in 95% EtOH, zweimal 6 min in 80% EtOH und 4 min in ddH<sub>2</sub>O). Anschließend folgte eine Kernfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin (1-3 min bei RT). Nach der Färbung wurden die Schnitte solange mit Wasser gewaschen bis keine Trübung mehr im H<sub>2</sub>O zu sehen war. Zur Verminderung der Hintergrundfärbung folgten zwei weitere Waschschrte mit einer sauren Alkohol-Lösung (400 ml Methanol, 4 ml Essigsäure, 96 ml ddH<sub>2</sub>O). Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit ddH<sub>2</sub>O, und dreimal mit 80% EtOH gewaschen (jeweils 4 min, RT). Anschließend wurde eine Plasmafärbung für 3 min bei RT mit Eosin durchgeführt. Nun wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe EtOH gewaschen (dreimal 3 min 95% EtOH, einmal 1 min 100% EtOH, einmal 2-3 min 100% EtOH).

Abschließend wurden die Proben mit Xylen gewaschen (zweimal 5 min), getrocknet und mit Einschlussmedium und einem Deckgläschen eingedeckelt. Danach folgte die Auswertung am Mikroskop.

#### **3.9.2 Immunhistochemische Färbung von gefrorenen Tumoren**

Für die Färbung von Gefrierschnitten aus in Einbettmedium eingefrorenem Tumor- oder Organgewebe aus Mäusen wurden diese mit Hilfe eines Kryostaten in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf silanierte Objektträger überführt. Für die Fixierung der Schnitte wurden sie in eiskaltem Aceton inkubiert (10 min, -20 °C) und über Nacht. getrocknet. So

konnten die Schnitte bis zur eigentlichen Färbung bei -20 °C gelagert werden. Alle folgenden Schritte fanden bei RT statt.

Zunächst wurden die Präparate zweimal für 3 min mit TBS gewaschen und die endogenen Peroxidasen mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min blockiert. Nach dreimaligem Spülen à 3 min mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Proben für 20 min mit Blocking-Serum behandelt. Nach dem Blocken wurde der Primärantikörper 1:25 (1 µg) in Blocking-Serum zugegeben und für 90 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit ddH<sub>2</sub>O folgte eine Inkubation für 60 min mit dem Sekundärantikörper (1:150 (0,5 µg) in Blocking-Serum). Anschließend wurden die Proben dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Avidin/Biotin-POD-Komplex für 60-90 min inkubiert. Nach dreimal Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde ein POD-Substrat, welches nach Herstellerangaben angefertigt wurde, auf die Schnitte gegeben und für weitere 30 min inkubiert. Dabei wurde das Substrat umgesetzt und es färbte sich rötlich. Nun wurden die Schnitte dreimal gewaschen und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Die Schnitte wurden abschließend mit H<sub>2</sub>O abgespült bis im Wasser keine Farbreste mehr zu sehen waren. Zur Untersuchung und Aufbewahrung wurden die Schnitte mit Gelatine eingedeckelt.

### **3.10 Statistik**

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse zwischen verschiedenen Gruppen wurden, je nach Versuchsbedingung, mit einem Mann–Whitney-U- oder *unpaired-Student's-t-Test* bestimmt ( $n \geq 5$ ). Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn der p-Wert  $< 0.05$  beträgt. Ergebnisse mit höheren Signifikanzen (p-Werte  $< 0.01$  oder  $0.005$ ) wurden gesondert gekennzeichnet. Bei Ergebnissen die mit nur drei Stichproben erzielt wurden, wurde aufgrund fehlender Validität nicht auf statistische Unterschiede hin untersucht, sondern nur die Standardabweichung bestimmt.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Herstellung der DNA-Vakzine

#### 4.1.1 Auswahl der Minigen-Sequenzen

Für diese Arbeit wurden zwei Minigen-Vakzine gegen *MYCN* hergestellt, die jeweils für drei unterschiedliche *MYCN*-Epitope kodieren. Das erste Minigen wurde aus drei Epitopen generiert, welche innerhalb der Gesamt-Aminosäuresequenz von *MYCN* die höchsten vorhergesagten Bindungsaffinitäten zu dem MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> aufwiesen (*pMDV1*, siehe Tab. 4.1). Für das zweite Vakzin, welches als Negativ-Kontrolle diente, wurden Epitope mit einer niedrigen vorhergesagten Affinität zu dem MHC-Molekül ausgewählt (*MYCN<sub>Low</sub>*, s. Tab. 4.1). Zur Findung geeigneter Epitope für das jeweilige Minigen wurde die Gesamtproteinsequenz von *mMYCN* mit der Datenbank *syfpeithi* abgeglichen. Anhand von den dort ermittelten Bindungs-Scores wurden die Peptide mit der höchsten bzw. niedrigsten theoretischen Affinität zu H2-K<sup>k</sup>, dem MHC-Klasse-I-Allel der A/J-Maus, ausgewählt (Rammensee *et al.*, 1999). Abschließend wurden die Epitop-Sequenzen mit der Datenbank BIMAS verifiziert. In Tabelle 4.1 sind die H2-K<sup>k</sup>-Bindungsmotive, die für die Herstellung der Vakzine verwendet wurden, aufgelistet.

Dabei wurden für *pMDV1* (höchste Affinität), aufgrund ihres besseren Scores, Nonamere verwendet. Für *MYCN<sub>Low</sub>* wurden drei Oktamere ausgewählt, da sie die niedrigste Affinität zu H2-K<sup>k</sup> aufwiesen.

Tab. 4.1: Hergestellte Minigene und die durch sie kodierten MHC-Klasse-I-Epitope.

mMYCN-Minigene				
Name des Minigens	Aminosäure-Sequenz	Länge AS	zugrunde liegendes Protein (BLAST, SIB)	Score in syfpeithi
pMDV1	EDAPPQKKI	9	<i>MYCN</i> Proto-Onkogen Protein [ <i>Mus musculus</i> ]	24
	EEEDVVTV	9		23
	SERRRNHNI	9		23
MYCN <sub>Low</sub>	CTASTMPG	8	<i>MYCN</i> Proto-Onkogen Protein [ <i>Mus musculus</i> ]	0
	VNKREPAP	8		0
	KATEYVHS	8		0

Die Negativ-Kontrolle *MYCN<sub>Low</sub>* wurde konzipiert, um die Verlässlichkeit von Vorhersagen geeigneter MHC-Klasse-I-Liganden zu untersuchen.

Die Ausgewählten Peptide wurden anschließend von den Aminosäure- zurück in DNA-Sequenzen „übersetzt“ und die Minigene konzipiert. In der finalen Sequenz wurden die

ausgewählten Epitope über *Spacer*-Sequenzen miteinander verbunden und ein Myc-Tag sowie eine *Bgl*II-Schnittstellen angefügt (Abb. 4.1.1).

#### Peptid-Sequenz:

*Bgl*II-AAY-EDAPPQKKI-AAY-EEEIDVVTV-AAY-SERRRNHNI-AAY-EQKLISEEDL-Stop-*Eco*RI-*Bgl*II

#### DNA-Sequenz (168bp):

AGATCTTC-GCCGCCTAC-GAGGATGCGCCTCCACAAAAGAAAATC-GCCGCCTAC-GAGGAAGAAATAGTGTAGTGACAGTT-GCCGCCTAC  
*Bgl*II IF Spacer EDAPPQKKI – Epitop Spacer EEEIDVVTV – Epitop Spacer  
 AGTGAACGAAGAAGGAACCATATATA-GCTGCTTAT-GAACAAAAATTGATAAGTGAGGAAGATTTA-TAG-GAATTCAGATCT  
 SERRRNHNI– Epitop Spacer Myc-Tag Stop *Eco*RI *Bgl*II

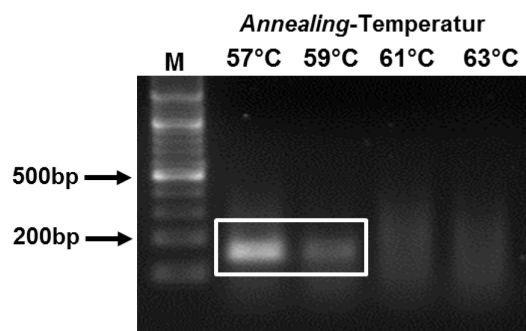
**Abb. 4.1.1: Exemplarischer Aufbau eines in dieser Arbeit verwendeten Minigenes.**

*Kursiv:* Restriktionsschnittstellen; fett, Großbuchstaben: *spacer*-Peptid; Stop: Ende der Translation; rot: H2-K<sup>k</sup>-Epitope; blau: Myc-Tag

Die Minigene wurden in einer überlappenden PCR mit Hilfe von Oligonukleotiden generiert, welche sich in einem 40bp großen Sequenzbereich überschneiden.

### 4.1.2 Herstellung der Minigene mittels überlappender PCR

Die überlappenden PCR zur Herstellung der Minigene wurden unter Verwendung eines Temperatur-Gradienten durchgeführt (Abb. 4.1.2).



**Abb. 4.1.2: Auftrennung einer Minigen-DNA im Agarose-Gel nach überlappender PCR.**

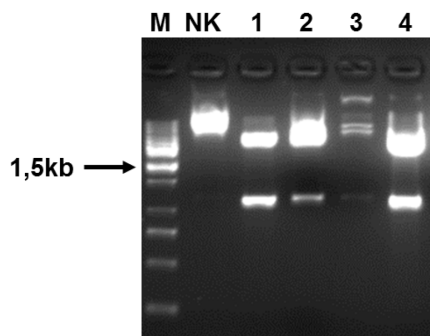
Die Ansätze einer überlappenden PCR wurden auf einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im weißen Rechteck sind die entstandenen Minigene markiert, die aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt wurden.

M= 100bp Marker.

Nach der PCR wurden die 168bp großen DNA-Produkte aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurden die isolierten Minigene zur Sequenzverifizierung in den Vektor pGEM-T Easy ligiert und der Einbau mittels Kontrollverdau mit *Bgl*II, der durch die Oligonukleotide eingefügten Schnittstelle (Abb. 4.1.1), kontrolliert. Klone, die nach Verdau eine DNA-Bande bei ca. 168bp zeigten, wurden zum Sequenzieren geschickt.

### 4.1.3 Herstellung der MYCN-cDNA Vakzine

Das MYCN-cDNA-Vakzin wurde mit Hilfe einer PCR unter Verwendung einer *Pfu*-Polymerase hergestellt (Abschnitt 3.2.10). Dabei wurde die murine *MYCN*-cDNA (mMYCN) mit spezifischen Primern aus dem Vektor pCDV2-mMYCN amplifiziert und auf einem Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 4.1.3).

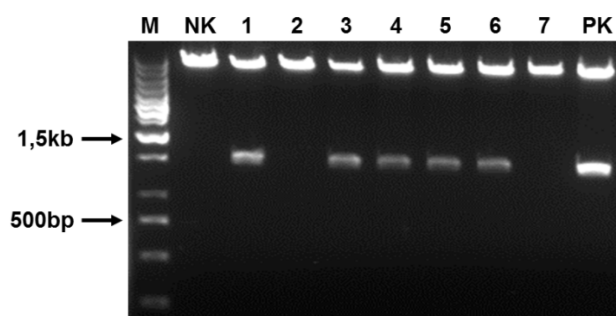


**Abb. 4.1.3: Durch PCR amplifizierte MYCN-cDNA.**

Gezeigt sind die elektrophoretisch aufgetrennten Ansätze einer PCR mit pCDV2-mMYCN unter Verwendung *MYCN*-cDNA-spezifischen Primern auf einem 1%igen Agarose-Gel. In den Ansätzen 1, 2 und 4 ist die cDNA als ca. 1,4kb große DNA-Bande zu sehen. In Ansatz 3 ist keine deutliche Bande sichtbar.

**NK**= Negativ-Kontrolle; **M**= 1kb Marker.

Die DNA-Banden auf Höhe von ca. 1,4kb wurden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde ein *A-Tailing* durchgeführt (Abschnitt 3.2.10), da bei einer PCR mit *Pfu*-Polymerase keine TA-Überhänge entstehen, die zum Klonieren in pGEM-T Easy benötigt wurden. Nach dem *Tailing*, wurden die Fragmente in das Klonierungsplasmid ligiert und in *E.coli* JM109 transfiziert. Nach einer Minipräparation wurde ein Kontrollverdau mit *Bam*HI, einer während der PCR künstlich eingefügten Restriktionsschnittstelle, durchgeführt (Abb. 4.1.4).



**Abb. 4.1.4: Aufgetrennte MYCN-cDNA.**

Gezeigt sind Proben der mit *Bam*HI kontrollverdauten *MYCN*-cDNA-Klone auf einem 1%igen Agarose-Gel (1-7). Positive *MYCN*-cDNA-tragende Klone sind die Nummern 1, 3, 4, 5, und 6.

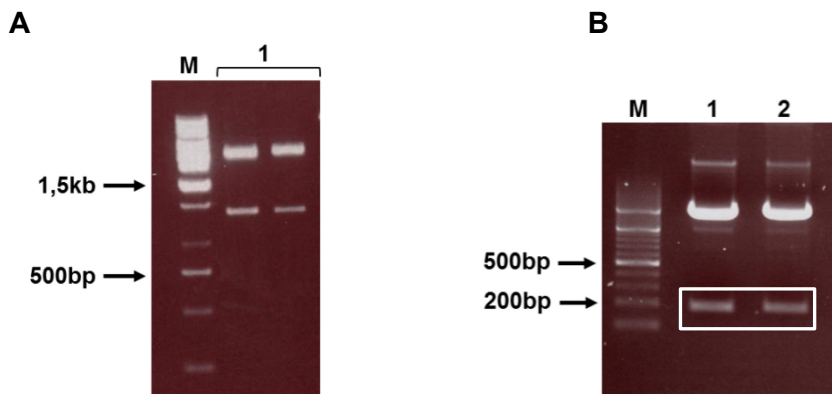
**NK**= Negativ-Kontrolle; **PK**= Positiv-Kontrolle; **M**= 1kb Marker.

Die Ansätze, bei denen eine Bande auf Höhe von ca. 1,4kb zu finden war, wurden zur Verifizierung zum Sequenzieren geschickt.

### 4.1.4 Subklonierung der Vakzin-Sequenzen in den Vektor pCMV-F3Ub

Nach Verifizierung der DNA-Sequenzen von den Minigenen und der *MYCN*-cDNA wurden diese mittels Restriktionsverdau mit *Bam*HI (cDNA) oder *Bgl*II (Minigene) aus pGEM-T Easy

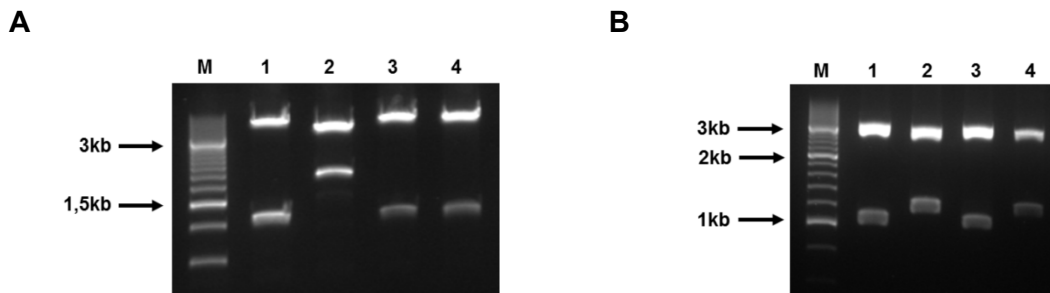
geschnitten, um sie im Anschluss in den Expressionsvektor pCMV-F3Ub zu klonieren (Abb. 4.1.5).



**Abb. 4.1.5: Nachweis der *MYCN*-cDNA und Minigene nach Restriktionsverdau.**

- A)** *MYCN*-cDNA wurde mit *Bam*HI aus p-GEM-T Easy geschnitten und der Verdau auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen. Es wurde zweimal der gleiche Klon geschnitten (1). Die markierten Banden bei ca. 1,4kb wurden ausgeschnitten. **M**= 1kb Marker.
- B)** Minigene wurden mit *Bgl*II aus p-GEM-T Easy geschnitten und nach Verdau auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetragen. Die markierten DNA-Banden der Minigene auf Höhe von ca. 168bp wurden ausgeschnitten und aufgereinigt. In der Spur 1 ist ein Klon des pMDV1-, in Spur 2 des MYCN<sup>Low</sup> Minigenes aufgetragen. **M**= 200bp Marker.

Nach Auftrennung im Agarosegel wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI bzw. *Bgl*II linearisierten und mit einer alkalischen Phosphatase (zur Vermeidung von Selbstligation) behandelten Expressionsvektor pCMV-F3Ub subkloniert. Anschließend wurde ein erneuter Kontrollverdau zur Feststellung der Orientierung (5' zu 3') des jeweiligen Vakzins im Vektor durchgeführt. Durch die Restriktion der Minigen-Vakzine mit *Eco*RI sollten Fragmente von 1260bp bei korrekter und 1080bp bei falscher Orientierung im Plasmid entstehen (Abb. 4.1.6A). Beim cDNA-Impfstoff wurde das Restriktionsenzym *Not*I verwendet, hier entstand bei richtiger Orientierung ein Fragment von ca. 1,4kb und bei falscher eine Bande auf Höhe von ca. 2,2kb (Abb. 4.1.6B).



**Abb. 4.1.6: Untersuchung der Minigen- und MYCN-cDNA-Orientierung im Vektor pCMV-F3Ub.**

- A)** Verifizierung der Orientierung der MYCN-cDNA im Vektor pCMV-F3Ub. Plasmid-DNA von 4 Klonen (1-4) wurde mit *NotI* verdaut und auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen. Bei korrekter Orientierung der cDNA entstand ein DNA-Fragment in Größe von ca. 1,4kb (1, 3 und 4). **M**= 1kb Marker.
- B)** Verifizierung der Orientierung der Minigene im Vektor pCMV-F3Ub. Plasmid-DNA aus Klonen (1-4) wurde mit *EcoRI* verdaut und auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetragen. Der Verdau sollte bei richtiger Orientierung der Minigene zu Banden auf Höhe von 1260bp führen (2 und 4). In den Spuren 1-2 wurden Proben mit pMDV1 und in 3-4 DNA von MYCN<sub>Low</sub> aufgetragen. **M**= 500bp Marker.

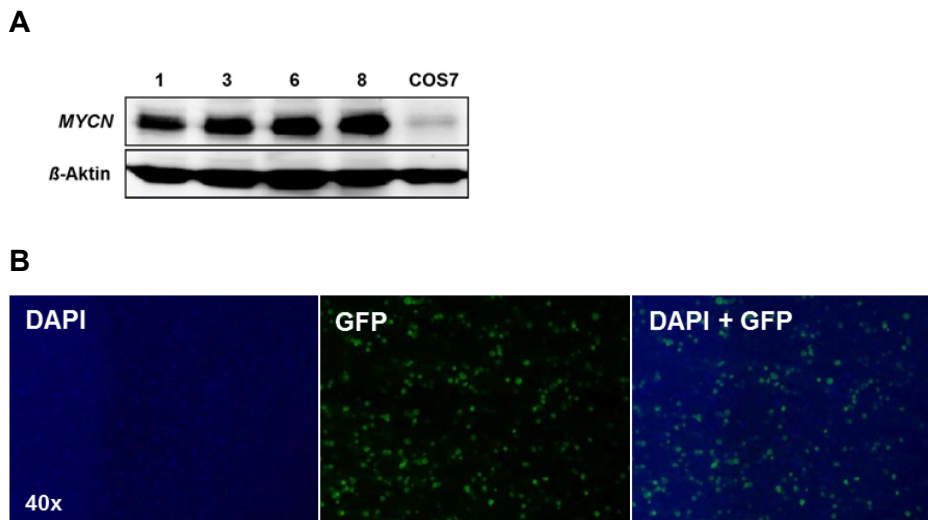
Die verifizierten Plasmid-Vakzine wurden schließlich mittels Elektroporation in *Salmonella typhimurium* SL7207 transformiert (Abschnitt 3.2.7) und bis zur Anwendung als Bakterienstock bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.5 Nachweis der Expression der Minigen- und cDNA-Vakzinen *in vitro*

Da eine korrekte Expression der DNA-Vakzine *in vivo* für die Impfversuche essentiell ist, wurde diese zunächst *in vitro* mittels Western-Blot unter Verwendung eines Myc-Tag- (Minigene) oder MycN-spezifischen-Ak (cDNA) nachgewiesen.

Zum Nachweis der cDNA-Expression im Western-Blot wurden COS7-Zellen transient mit den cDNA-Vakzinen transfiziert (Abschnitt 3.5.3), Zelllysate nach 1, 3, 6 und 8h hergestellt und mit diesen eine *SDS-Page* durchgeführt. Die Expression wurde anschließend im Western-Blot mit einem spezifischen MycN-Antikörper nachgewiesen (Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3) (Abb.4.1.7A).

Der Nachweis der Minigen-Expression mittels Western-Blot war (Myc-Tag), aufgrund der kleinen Peptid-Größe, nicht eindeutig möglich (nicht abgebildet). Deswegen wurde zusätzlich, zum prinzipiellen Nachweis der Minigen-Expression, ein GFP-tragendes Kontrollplasmid hergestellt (pCMV-F3Ub-Minigen-GFP). In diesem wurde EGFP dem Minigen *in frame* ohne eigenes Start-Codon nachgeschaltet. Mit diesem Plasmid (Minigen-EGFP) wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und die EGFP-Expression, zum Nachweis der funktionalen Expression des Fusionspeptids, mit einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert (Abb. 4.1.7B).



**Abb. 4.1.7: Nachweis der DNA-Vakzin-Expression *in vitro*.**

- A)** Nachweis der *MYCN*-cDNA-Vakzin-Expression mittels Western-Blot. Transfizierte Zellen wurden nach 1, 3, 6 und 8h lysiert und ein Western-Blot durchgeführt. COS7= nicht transfizierte COS7 Zellen; 1-8= transfizierte COS7-Zelllysate in h nach Transfektion.
- B)** Nachweis der Minigen-Expression in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden transient mit einem pCMV-F3Ub-Minigen-GFP-Vektor transfiziert. 24h später wurden die Zellen fixiert, eine DAPI-Färbung durchgeführt und die GFP-Expression mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. **Links** - DAPI-Kernfärbung; **Mitte** - GFP-Expression der Plasmide; **Rechts** - beide Färbungen übereinander gelegt.

Mit Hilfe des EGFP konnte die Expression der Minigene und mittels Western-Blot die des *MYCN*-cDNA-Vakzins *in vitro* nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nun die immunologische Wirkung der Impfstoffe *in vivo* untersucht.

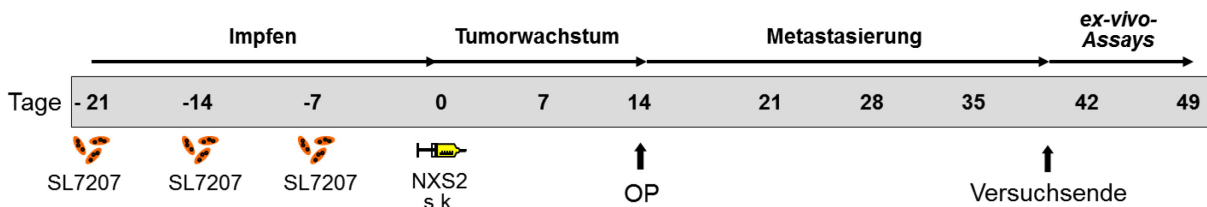
## 4.2 Untersuchung der DNA-Vakzine *in vivo*

### 4.2.1 *MYCN*-Vakzinierung reduziert das wt-NXS2-Primärtumorwachstum in A/J-Mäusen

Das in unserem Labor etablierte NXS2-Neuroblastom-Mausmodell bietet neben dem Primärtumorwachstum, die spontane Metastasierung als zusätzlichen Parameter, welche zur Auswertung der antitumoralen Wirkung eines Impfstoffes herangezogen werden kann. Mit diesem Modell wurden die ersten Vakzinierungsversuche durchgeführt. Dabei sollte die immunogene Wirkung der *MYCN*-DNA-Vakzine auf gering *MYCN*-exprimierende Wildtyp-NXS2-Zellen (wt-NXS2) in syngenen A/J-Mäusen untersucht werden.

Es wurden drei unterschiedlich behandelte Mausgruppen á fünf Tiere verglichen (n=5). Eine Gruppe wurde mit den Leervektor pCMV-F3Ub tragenden *S. typhimurium* (=Mock-Kontrolle) behandelt. Die zweite Gruppe wurde mit dem DNA-Impfstoff pMDV1 und eine weitere mit dem *MYCN*-cDNA-Vakzin geimpft. Auf eine unbehandelte Kontrollgruppe wurde verzichtet,

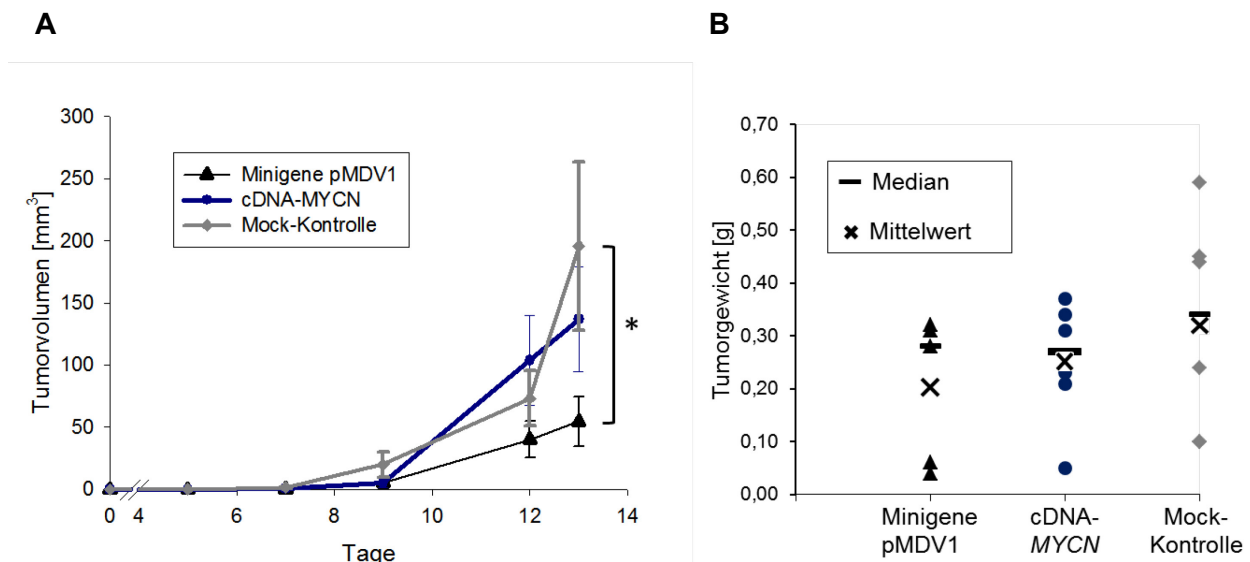
da in vorangegangenen Tierversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass es keine signifikanten Unterschiede beim Tumorwachstum unbehandelter und mit Leervektor behandelter Mäuse gibt (Huebener *et al.*, 2008; Fest *et al.*, 2009; Huebener *et al.*, 2009b). Der *in-vivo*-Versuch wurde wie in Abschnitt 3.7 beschrieben durchgeführt und ein prophylaktischer Versuchsablauf gewählt (Abb. 4.2.1).



**Abb. 4.2.1: Prophylaktischer *in-vivo*-Versuchsablauf.**

Die Mäuse wurden im Abstand von 7 Tagen mit je  $5 \times 10^8$  Vakzin-tragenden Salmonellen oral geimpft (Tage -21, -14, -7). Am Tag 0 wurde den Tieren eine letale Dosis wt-NXS2-Zellen ( $2 \times 10^6$ ) subkutan (s.c.) injiziert. Ungefähr am Tag 14 nach Tumorenjektion, in Abhängigkeit von der gemessenen Tumorgroße, wurde dieser operativ entfernt. Im weiteren Verlauf wurde die Metastasierung der Tiere beobachtet. Der Versuch wurde beendet, wenn Mäuse einer Gruppe äußerlich erkennbar erkrankt waren. Die Metastasen aller Tiere wurden ausgewertet und verglichen. Zusätzlich wurden *ex-vivo*-Assays zur Charakterisierung der Immunantwort durchgeführt.

Nach Injektion der NXS2-Tumorzellen in die Flanke der Tiere wurde das primäre Tumorwachstum alle zwei Tage gemessen und dokumentiert (Abb. 4.2.2A). Erreichten die Tumoren einer Mausgruppe ein Volumen von mehr als  $500 \text{ mm}^3$ , wurden die Tumoren aller Versuchstiere entfernt und ihr Gewicht bestimmt (Abb. 4.2.2B).



**Abb. 4.2.2: Subkutanes Primärtumorwachstum und -gewicht nach oraler Vakzinierung.**

A/J-Mäuse wurden, wie in Abbildung 4.2.1 aufgeführt, dreimal an sieben Tagen mit  $5 \times 10^8$  Vakzin-tragenden Salmonellen geimpft. Dann wurden den Tieren  $2 \times 10^6$  wt-NXS2-Zellen subkutan injiziert und in den folgenden 13 Tagen das Primärtumorwachstum bestimmt (A). Am Tag 14 wurden alle Tumoren operativ entfernt und gewogen (B).

- A)** Gezeigt ist das mittlere Primärtumorwachstum der jeweiligen geimpften Gruppen mit dem berechneten Standardfehler. Das Tumorstadium in den pMDV1-behandelten Tieren war nach Impfung deutlich, aber nicht signifikant ( $p = 0,0887$ ), langsamer als bei den Tieren der Mock-Kontrolle.
- B)** Abgebildet sind die Tumorgewichte einzelner Tumoren aus behandelten Mäusen und die daraus ermittelten Mittelwerte und Mediane der jeweiligen Gruppen. Bei den Tumorgewichten gab es zwischen den behandelten Gruppen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.  
(\* =  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-U-Test). ( $n = 5$ ).

Bei diesem Versuch konnte sowohl mit Hilfe des cDNA-Vakzins, als auch mit pMDV1, eine deutliche, aber nicht signifikante Reduktion des wt-NXS2-Primärtumorwachstums im Vergleich zur Mock-Kontrolle hervorgerufen werden ( $p = 0,0887$  pMDV1;  $p = 0,9307$  MYCN-cDNA). Das geringste Tumorstadium zeigte dabei die Gruppe der pMDV1-behandelten Tiere.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den gemittelten Tumorgewichten wider, die Unterschiede waren bei diesen aber nicht so deutlich wie beim Wachstum (Abb. 4.2.2B). So wiesen die Tumoren der pMDV1-behandelten Tiere das geringste- (0,287 g) und die der Kontrollgruppe das höchste Gewicht auf (0,35 g).

Im weiteren Versuchsverlauf entwickelten die operierten Mäuse Metastasen. Als die ersten Tiere äußerlich erkennbar erkrankten, wurde der gesamte Versuch beendet und der Metastasierungsgrad der einzelnen Tiere bestimmt. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der Behandlung wurde in allen Tieren nach ca. 30 Tagen eine starke Metastasierung festgestellt. Der Befall

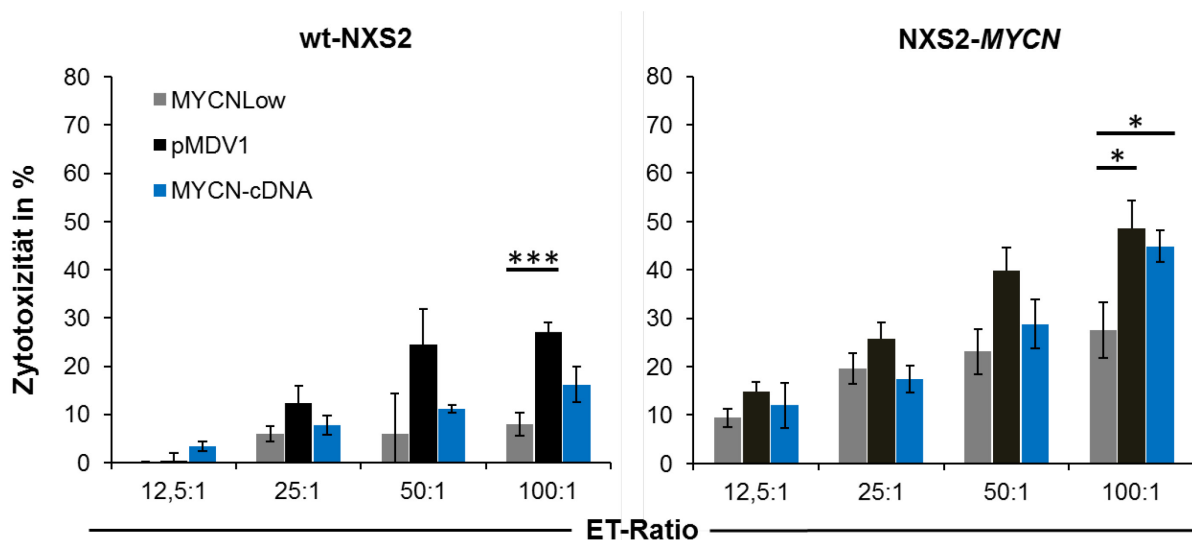


der untersuchten Organe war in allen Mäusen ähnlich und betraf Leber, Nieren, Nebennieren, Lymphknoten und Ovarien.

Anhand der Ergebnisse dieses *in-vivo*-Experiments war bereits eine immunologische Wirkung der Vakzine in diesem gering *MYCN*-exprimierenden Modell sichtbar. In den anschließenden *ex-vivo*-Assays wurde die Immunantwort zur Analyse *MYCN*-spezifischer CTL genauer charakterisiert.

#### 4.2.2 *MYCN*-spezifische T-Lymphozyten vermitteln Anti-Tumor-Antwort

Mit Hilfe von Chrom-Release- Zytotoxizitätsassays wurde im Anschluss der *in-vivo*-Versuche untersucht, ob die antitumorale Immunantwort durch *MYCN*-spezifische T-Lymphozyten vermittelt wurde (Abschnitt 3.8.3). Zu diesem Zweck wurden Splenozyten aus den Milzen der geimpften Tiere isoliert und als Effektorzellen gegen gering (wt-NXS2) und hoch *MYCN*-exprimierende NXS2-Zellen eingesetzt. Für die *MYCN*-exprimierenden Zellen wurden wt-NXS2 transient mit einem *MYCN*-cDNA-Expressionsvektor transfiziert (Abb. 4.2.3).



**Abb. 4.2.3: Zytotoxizität isolierter Lymphozyten aus geimpften Mäusen gegen wt-NXS2-Zellen.**

Splenozyten wurden aus den Milzen geimpfter Mäuse isoliert und Gruppen-spezifisch gepoolt. Nach fünftägiger Reaktivierung mit IL-2 wurden diese auf  $^{51}\text{Cr}$ -beladene Zielzellen gegeben. Als Zielzellen wurden je Well 1x 10<sup>5</sup> wt-NXS2 (links) oder *MYCN*-transfizierte NXS2-Zellen verwendet (rechts). Die Effektorzellen wurden in den ET-Verhältnissen 12,5 bis 100:1 zugegeben. Nach 6h Inkubation wurde der  $^{51}\text{Cr}$ -Gehalt im Überstand der einzelnen Wells bestimmt. Alle Werte wurden anhand von Triplets bestimmt und die hier aufgeführten Ergebnisse aus drei Experimenten gemittelt.

Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

(\* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; *unpaired-Student's T-Test*). (n=3).

Anhand der Ergebnisse des Assays zeigte sich, dass die Splenozyten aller behandelten Mausgruppen *MYCN*-transfizierte Zellen (rechts) insgesamt stärker lysieren als wt-NXS2-

Zellen (links) und die gemessene Zytotoxizität mit zunehmendem ET-Verhältnis ansteigt. So stieg die prozentuale Zytotoxizität in der pMDV1-Gruppe gegenüber *MYCN*-transfizierte NXS2-Zellen von 15% (ET-Ratio 12,5:1) auf ca. 50% (ET-Ratio 100:1), und war signifikant erhöht im Vergleich zu *MYCN*<sub>Low</sub> ( $p=0,041$ , bei ET 100:1). Die Splenozyten der *MYCN*-cDNA-Mäuse zeigten gegenüber diesen Zellen ebenfalls eine höhere Effektivität als die *MYCN*<sub>Low</sub>-Splenozyten, aber eine etwas geringere als die der pMDV1-Tiere ( $p=0,049$ ). Die vermittelte Zytotoxizität der Splenozyten von *MYCN*<sub>Low</sub> gegenüber den transfizierten Zellen stieg mit zunehmendem ET-Verhältnis von 10% (12,5:1) bis auf maximal 25% (100:1).

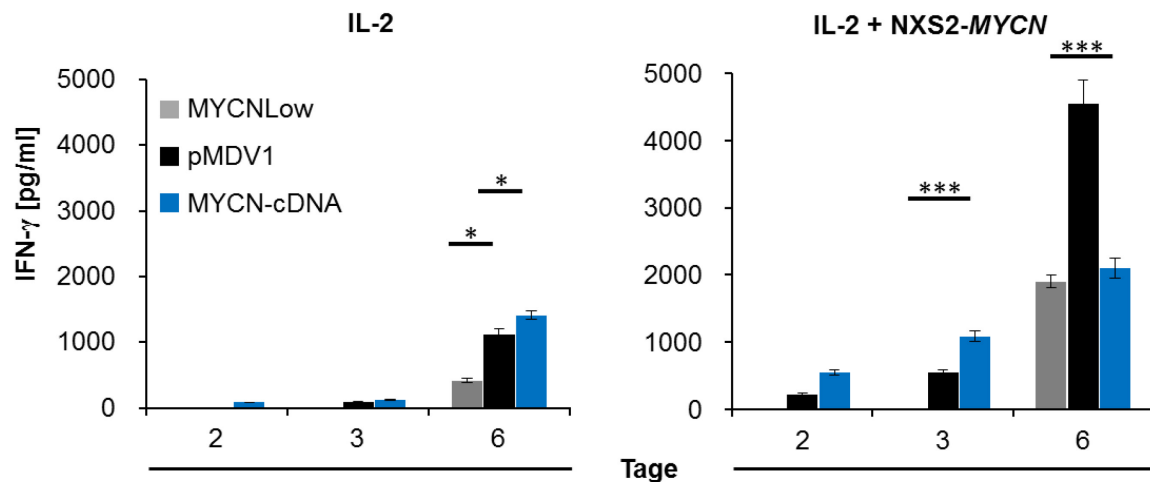
Wurden hingegen wt-NXS2 als Zielzellen eingesetzt war die Zytotoxizität insgesamt niedriger, aber die Differenz zwischen den Splenozyten der Gruppen pMDV1- und *MYCN*<sub>Low</sub> nahm zu (linker Graph, Abb. 4.2.3). Die Gruppe der *MYCN*<sub>Low</sub>-behandelten Tiere zeigten bei einem ET-Verhältnis von 12,5:1 nahezu keine Lyse. Mit steigender ET-Ratio stieg der gemessene  $^{51}\text{Cr}$ -Release auf maximal 9% (100:1). Die Lymphozyten aus der pMDV1-behandelten Gruppe wiesen bei einer ET-Ratio von 12,5:1 ebenfalls nur eine geringe Zytotoxizität auf, die aber mit zunehmendem ET-Verhältnis auf über 30% stieg und hoch signifikant gegenüber *MYCN*<sub>Low</sub> erhöht war ( $p=0,0008$ ). Auch die Splenozyten der *MYCN*-cDNA behandelten Mäuse zeigten eine höhere Effektivität gegenüber den wt-NXS2-Zellen im Vergleich zur *MYCN*<sub>Low</sub>-Kontrolle, aber insgesamt eine stets geringere als die der pMDV1-Tiere.

Diese Resultate zeigen eine Spezifität der Lymphozyten aus pMDV1- und *MYCN*-cDNA-geimpften Tieren gegenüber *MYCN*-exprimierenden NXS2-Zellen.

#### 4.2.3 Analyse der Antigenspezifität von Lymphozyten geimpfter Mäuse

Eine weitere Methode, um Antigen-spezifische Lymphozyten nachzuweisen, ist die Bestimmung des proinflammatorischen Zytokins Interferon- $\gamma$  nach Stimulation mit einem spezifischen Antigen mittels ELISA (Abschnitt 3.8.2).

In diesem Versuch wurden die isolierten Splenozyten neben IL-2 mit *MYCN*-exprimierende NXS2-Zellen stimuliert. Aufgrund der auf der Oberfläche präsentierten *MYCN*-Epitope (Antigene) sollten *MYCN*-spezifische T-Lymphozyten aus den *MYCN*-Vakzin-behandelten Mäusen stärker zur Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$  angeregt werden, als welche aus den Kontrollmäusen. Die Stimulierung der Immunzellen erfolgte über einen Zeitraum von sechs Tagen. Täglich wurden Kulturüberstände abgenommen und nach Beendigung des Versuchs die Konzentration des freigesetzten IFN- $\gamma$  der Tage 2, 3 und 6 mit Hilfe eines ELISA gemessen (Abb. 4.2.4).



**Abb. 4.2.4: IFN- $\gamma$ -Sekretion isolierter Splenozyten aus geimpften Mäusen.**

Splenozyten wurden am Ende des Tierversuchs aus den behandelten Mäusen isoliert und für 6 Tage mit IL-2 oder mit IL-2 und inaktivierten (durch 50 Gy Bestrahlung) MYCN-transfizierten NXS2-Zellen im Verhältnis von 100:1 (Lymphozyten:MYCN-NXS2) stimuliert. Täglich wurden 250  $\mu$ l des Zellkulturüberstands abgenommen. Nach 7 Tagen wurde die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen mit Hilfe eines ELISA ermittelt. Dargestellt sind die gemittelten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der Tage 2, 3, und 6 in pg/ml aus drei unabhängig voneinander durchgeführten ELISA.

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

(\* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; *unpaired-Student's T-Test*). (n=3).

Anhand der Ergebnisse wurde festgestellt, dass unabhängig von der Impfung, die IFN- $\gamma$ -Sekretion bei Stimulierung mit IL-2 und MYCN-transfizierten NXS2-Zellen insgesamt höher war als bei reiner IL-2 Gabe. Wurde nur IL-2 dem Medium zugefügt, war eine signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$  Sekretion nach sechs Tagen bei den Lymphozyten der MYCN-cDNA- und pMDV1-behandelten Gruppen im Vergleich zur MYCN<sup>Low</sup>-Gruppe zu verzeichnen ( $p=0,039$  bzw.  $p=0,0478$ ).

Wurden die Zellen hingegen sowohl mit IL-2 und bestrahlten MYCN-NXS2-Zellen stimuliert, wurde von den Lymphozyten der pMDV1- und MYCN-cDNA-geimpften Gruppen deutlich mehr IFN- $\gamma$  freigesetzt, wohingegen die Kontrollgruppe erst am Tag sechs detektierbare Mengen produzierte. Am Tag sechs zeigten die Immunzellen der pMDV1-geimpften-Tiere die stärkste Sekretion von IFN- $\gamma$ . Die Konzentration vervielfachte sich von Tag 3 zu 6 und war hoch signifikant höher (ca. 4500 pg/ml) im Vergleich zu den Lymphozyten der beiden anderen Gruppen (ca. 2000 pg/ml) (MYCN<sup>Low</sup>  $p=0,00058$ ; MYCN-cDNA  $p=0,00075$ ).

Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung aus dem Zytotoxizitätsassay und zeigte, dass die isolierten Lymphozyten der pMDV1- und MYCN-cDNA-geimpften Tiere spezifisch durch MYCN-exprimierende Zellen stimuliert wurden.

### 4.3 Etablierung stabiler *MYCN*-überexprimierender C1300- und NXS2-Zelllinien

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass das Primärtumorwachstum von gering *MYCN*-exprimierenden wt-NXS2-Zellen in A/J-Mäusen durch die Applikation der *MYCN*-DNA-Vakzine im Vergleich zu Kontrollen reduziert werden kann. Ferner wurde die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen in geimpften Mäusen mit Hilfe von *ex-vivo*-Experimenten nachgewiesen.

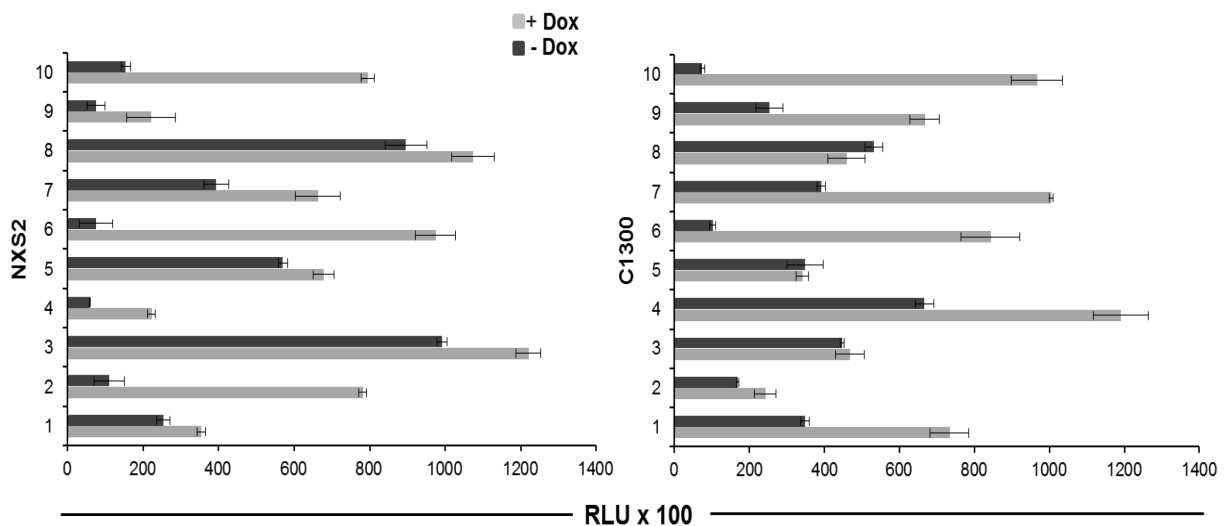
Um die Effektivität der *MYCN*-Vakzine gegen *MYCN*-überexprimierende Tumoren zu analysieren, sollten im weiteren Verlauf zwei neue *MYCN*-überexprimierende Neuroblastom-Zelllinien mit syngenen Charakter zu A/J-Mäusen etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden die wt-NXS2- und die dazu parentale wt-C1300-Zelllinien soweit modifiziert, dass sie *in vitro* und *in vivo* eine hohe stabile induzierbare *MYCN*-Expression aufwiesen.

#### 4.3.1 Stabile Transfektion des Repressorplasmids

Für die stabile Integration der *MYCN*-cDNA in das Genom der Zielzellen wurde das durch Tetracyclin (Tet) -Derivate induzierbare Vektorsystem T-REx™ von Invitrogen verwendet (siehe Abschnitt 3.5.5). Für dieses System mussten die Zielzellen mit dem Repressorplasmid (pcDNA6/TR) und dem *gene of interest* (GOI) tragenden Expressionsplasmid (pcDNA4/TO-MYCN) stabil transfiziert werden.

Zunächst wurden die wt-C1300- und wt-NXS2-Zellen mit dem zuvor linearisierten Vektor pcDNA6/TR transfiziert. Um eine stabile Integration des Plasmids zu fördern wurde kurz nach der Transfektion über den Zeitraum von 14 Tagen ein Selektionsdruck mit Blasticidin ausgeübt. Da das Plasmid pcDNA6/TR Träger eines Blasticidin-Resistenzgens ist, konnten aus den überlebenden Zellen Plasmid-tragende Einzelzellen isoliert und expandiert werden. Zur Untersuchung der Expression des Repressormoleküls wurden die ausgewählten Zellen mit den Reporter-Plasmiden pcDNA4/TO Luc B und D transient transfiziert und mit dem Tetracyclin-Analogon Doxycyclin inkubiert. In Verbindung mit einem *Dual-Luciferase*®-Reporter-Assay konnten so Rückschlüsse hinsichtlich Induzierbarkeit und Integration des Repressorplasmids gezogen werden (Abschnitt 3.5.6).

Insgesamt wurden jeweils 20 Klone der transfizierten Zelllinien NXS2 und C1300 untersucht. Die Ergebnisse von jeweils zehn repräsentativen Klonen sind in Abbildung 4.3.1 gezeigt.



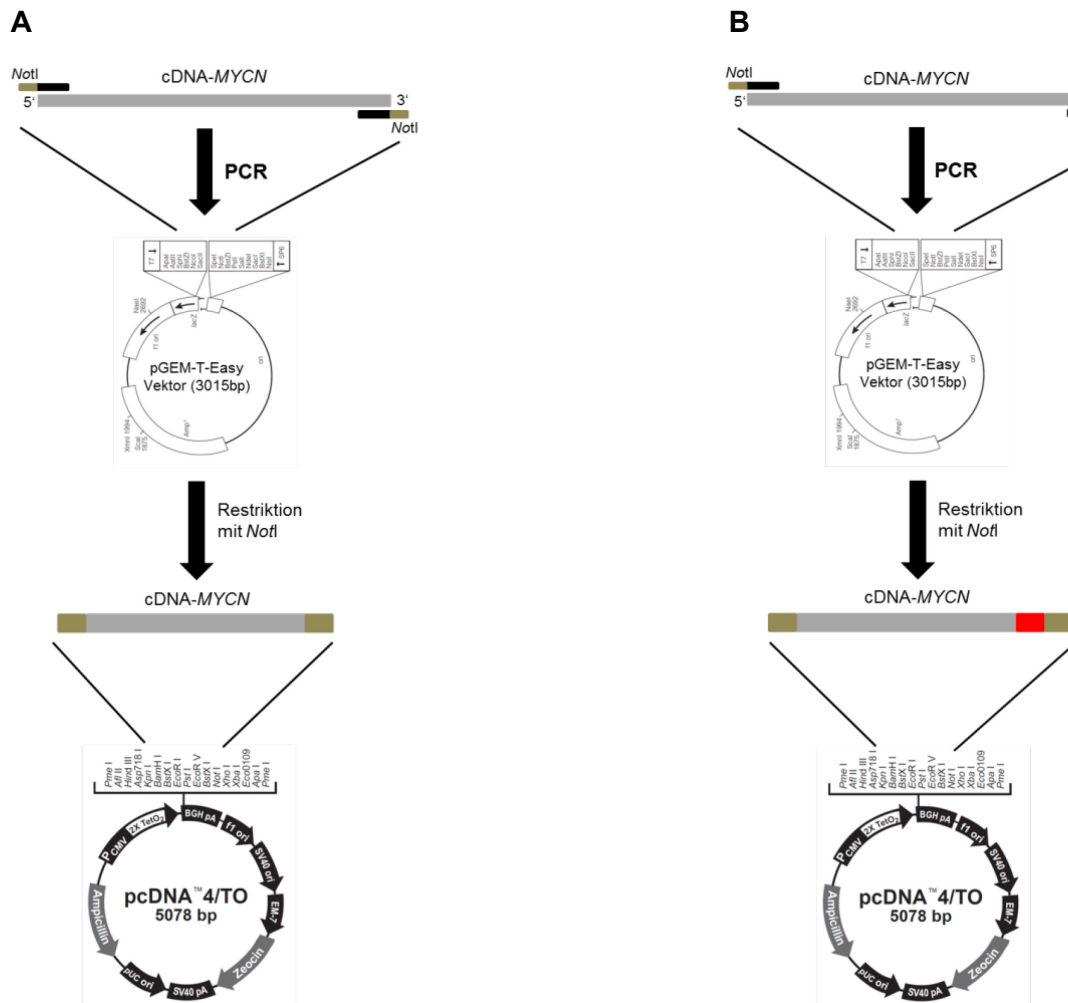
**Abb. 4.3.1: Dual-Luciferase®-Reporter-Assays zum Nachweis der Expression des Repressorplasmids.**

Für die Herstellung Tet-induzierbarer Zellen wurden wt-NXS2- und wt-C1300- Zellen mit einem Repressorplasmid (pcDNA6) stabil transfiziert. Nach Einzelzell-Isolierung wurde die Expression des Repressormoleküls in den Zellen mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Plasmiden und dem *Dual-Luciferase®-Reporter-Assay* von Promega untersucht (pcDNA4/TO Luc B und D). Abgebildet ist die gemessene Luciferase-Aktivität mit und ohne Zugabe von Doxycyclin (2 µg/ml) jeweils 10 ausgewählter stabil transfizierter C1300- und NXS2-Einzelzellpopulationen. Bei beiden Zelllinien wurde die Luciferase-Aktivität der Reporter-Plasmide mit Hilfe eines *Luminescence-Reader* in *relative light units* [RLU] bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken aufgeführt. (n=3).

Die Auswahl der weiter zu verwendenden Zellen erfolgte nach zwei Kriterien: gute Induzierbarkeit unter Doxycyclin sowie keine bis geringe basale Expression der Luciferase ohne Doxycyclin Zugabe. Den angegebenen RLU-Werten ist zu entnehmen, dass viele untersuchte Zellen das Repressorplasmid integriert hatten und die Expression der Reporter-Plasmide pcDNA4/TO Luc B und D ohne Zugabe von Doxycyclin reduziert und durch Zugabe induziert werden konnte. Für die weitere Etablierung der Tetracyclin-induzierbaren MYCN-NB-Zelllinien wurden die Zellen 6 (NXS2) und 10 (C1300) verwendet, die im weiteren Verlauf NXS2-6 und C1300-10 genannt wurden (siehe Abb. 4.3.1). Wie den Graphen zu entnehmen ist, zeigten diese Zellen die größte Differenz zwischen basaler und induzierter Luciferase-Aktivität.

Im nächsten Schritt wurden in diesen Zellen die zuvor klonierten MYCN-Plasmide pcDNA4/TO-MYCN oder pcDNA4/TO-MYCN-HA stabil integriert (Abb.4.3.2). Mit Hilfe des angefügten HA-Tags bei dem Plasmid pcDNA4/TO-MYCN-HA konnte im weiteren Verlauf die Expression des „getaggten“ Proteins mittels HA-Tag-spezifischen Antikörpers von der wt-MycN-Expression unterschieden werden.



**Abb.4.3.2: Klonierungsstrategie zur Herstellung der induzierbaren MYCN-pcDNA4-Vektoren.**

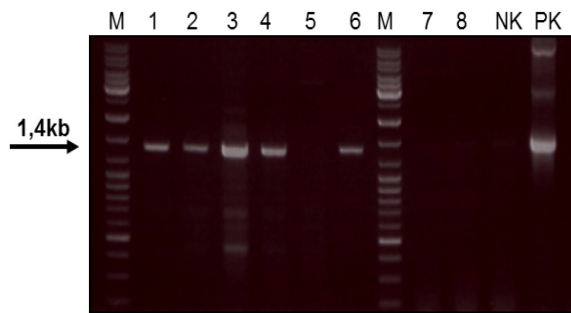
Es wurden zwei unterschiedliche pcDNA4/TO-Vektoren hergestellt. In ein Plasmid wurde die MYCN-cDNA (A) und in das zweite die MYCN-cDNA+HA-Tag (B) kloniert. Mit Hilfe von Primern wurden mit einer PCR eine NotI-Schnittstelle und ein HA-Tag *in frame* an die MYCN-cDNA angefügt. Das Zwischenprodukt wurde in den Sequenzierungsvektor pGEM-T-Easy kloniert. Nach Verifizierung der MYCN-cDNA-Sequenz wurde diese mittels NotI-Restriktionsverdau isoliert und in das zuvor ebenfalls mit NotI linearisierte Plasmid pcDNA4/TO kloniert.

Die hergestellten Vektoren wurden in mehreren Transfektionsansätzen stabil in die Klone C1300-10 und NXS2-6 integriert und die transfizierten Zellkolonien expandiert. Aus diesen wurden nach einer Antibiotika-Selektion mit Zeocin™ und Blasticidin Einzelzellen generiert, die im weiteren Verlauf genauer charakterisiert wurden.

#### 4.3.2 Analyse der genomischen Integration des Transgens

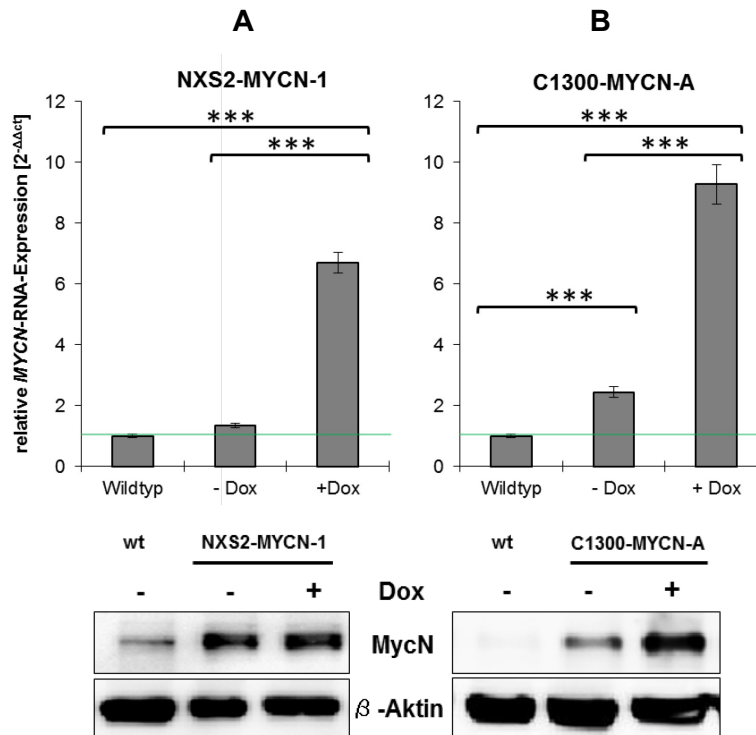
Von den Einzelzellen wurde nach ausreichender Expansion genomische DNA (gDNA) isoliert. Zur Kontrolle der Integration der Vektoren pcDNA4/TO-MYCN und pcDNA4/TO-MYCN-HA in das Genom dieser Zellen wurde mit dieser eine PCR unter Verwendung

**M**= 100bp-Marker; **NK**= Negativ-Kontrolle; **PK**= Positiv-Kontrolle (Plasmid pCDNA4/MYCN-cDNA).



Anhand der Resultate der Western-Blot-Analysen und TaqMan-q-PCR wurden schließlich zwei Zelllinien ausgewählt, die auf RNA- und Protein-Ebene den besten Kompromiss aus geringer basaler und hoher induzierbarer *MYCN*-Expression boten (Abb. 4.3.4). Es handelte

sich dabei um die Zellen C1300+MYCN-cDNA+HA-Tag und NXS2+MYCN-cDNA-HA-Tag, die im weiteren Verlauf der Arbeit als NXS2-MYCN-1 und C1300-MYCN-A bezeichnet wurden.



**Abb. 4.3.4: Basale und induzierte MYCN-Expression von C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1.**

Anhand der q-PCR-Daten wurden zwei Einzelzelllinien ausgewählt. Aus diesen wurde RNA ohne und nach 6h Behandlung mit Doxycyclin isoliert und eine MYCN-spezifische TaqMan-q-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der q-PCR wurden anhand der RNA-Expression der jeweiligen wt-Zelllinie normalisiert. Als Referenzgen wurde 18s-RNA verwendet. Im Graphen sind die gemittelten Ergebnisse aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen gezeigt.

Unter den Graphen sind die zugehörigen Western-Blots der jeweiligen Zelllinien aufgeführt. Für den Western-Blot wurden Kontroll-behandelte und 6h mit 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin inkubierte Zellen lysiert. Zum Vergleich wurden Proteinlysate der wt-Zellen aufgetragen. Für die SDS-PAGE wurde 40  $\mu$ g Gesamtprotein verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit einem MYCN-spezifischen Antikörper.

(\*\*\*=  $p < 0.001$ , *unpaired-Student's-t-Test*). (n=5).

- A)** Ausgewählte NXS2-MYCN-1-Zelllinie mit hoch signifikanter Differenz zwischen basaler und induzierter MYCN-Expression.
  - B)** Ausgewählte C1300-MYCN-A-Zelllinie mit hoch signifikanter Differenz zwischen basaler und induzierter MYCN-Expression.
- Grüner Balken** = MYCN-RNA-Expression der jeweiligen wt-Zelllinien = 1.

Anhand der q-PCR wurde sichtbar, dass beide Zelllinien eine leicht erhöhte basale MYCN-RNA-Expression im Vergleich zur jeweiligen wt-Zelllinie aufwiesen (-Dox), die bei C1300-MYCN-A sogar hoch signifikant erhöht war. Mit Induktion des Transgens stieg die relative MYCN-RNA-Expression hoch signifikant vom 0,4fachen (NXS2-MYCN-A) bzw. 1,3fachen (C1300-MYCN-A) auf das 5,7fache bzw. 8,4fache im Vergleich zu den jeweiligen wt-Zellen. Die Proteinexpression beider Zelllinien korrelierte dabei größtenteils mit den Resultaten der q-PCR; einzig die basale MycN-Protein-Menge bei NXS2-MYCN-1 war deutlich höher als

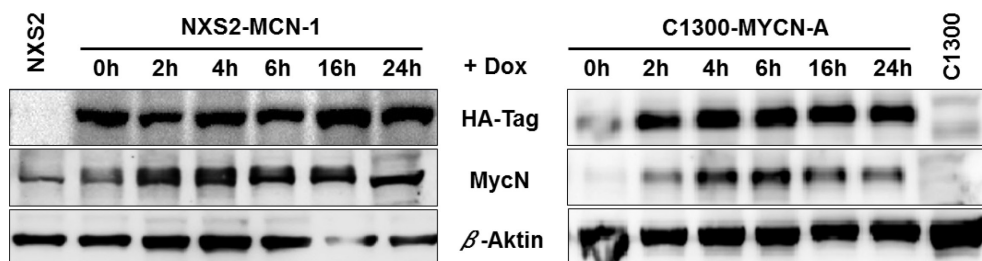


die von C1300-MYCN-A. Bei NXS2-MYCN-1 nahm die Protein-Expression nach Induktion durch Doxycyclin nur noch geringfügig zu. Anders C1300-MYCN-A: bei diesen Zellen war in den Western-Blot-Analysen ohne Behandlung wenig, und nach Gabe von Doxycyclin eine deutliche erhöhte Menge des MycN-Proteins nachweisbar.

Somit konnte in beiden Zelllinien eine hohe MYCN-Gen- und Protein-Expression nach Induktion durch Doxycyclin nachgewiesen werden, die für die folgenden Versuche entscheidend war.

#### 4.3.4 Expressionskinetik der Transfektanten

Um für die weiteren Versuche den optimalen Zeitpunkt zur Analyse von MycN und dessen Auswirkung zu finden, wurde mit den ausgewählten Transfektanten eine zeitliche Expressionskinetik nach Zugabe von Doxycyclin durchgeführt. Dafür wurden Proteinlysate von C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Doxycyclin hergestellt und mittels Western-Blot analysiert. Neben MycN, wurde auch das spezifische Transgen-Produkt anhand des HA-Tags nachgewiesen (Abb. 4.3.5).



**Abb. 4.3.5: Zeitliche Expression von MycN und MycN-HA-Tag nach Zugabe von Doxycyclin.**

Zellen wurden für 0-24h mit 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin inkubiert und anschließend Proteinlysate hergestellt. 40  $\mu$ g Gesamtprotein wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen. Der Nachweis der Protein-Expression auf dem anschließenden Blot wurde mit einem MycN- oder HA-spezifischen Antikörper durchgeführt.

Auch in diesem Versuch zeigten die NXS2-MYCN-1-Zellen bereits unbehandelt eine hohe basale Expression von MycN und MycN-HA-Tag. Interessanterweise war beim endogenen MycN-Protein eine Zunahme der Proteinmenge bis 6h erkennbar, die sich aber nicht in der MycN-HA-Expression des Transgens widerspiegelte, bei diesen wiesen alle Lysate über den gesamten Zeitraum eine etwa gleichbleibende Protein-Menge auf. Bei der wt-Zelllinie NXS2 war eine geringe MycN-Expression erkennbar.

Die C1300-MYCN-A-Zellen zeigten im unbehandelten Zustand (0h) eine sehr geringe basale Expression von MycN und MycN-HA-Tag, die nach zweistündiger Induktion mit Doxycyclin deutlich zunahm. Die höchste Expressionsrate des endogenen MycN war bei diesen

Zellen nach 6h erreicht. Bei dieser Zelllinie wiesen die Lysate nach zweistündiger Inkubation mit Doxycyclin, ebenfalls eine über den restlichen Zeitraum nahezu gleichbleibende Menge des Transgen-Produktes MycN-HA auf. In den wt-C1300 Zellen konnte kein endogenes als auch transgenes MycN nachgewiesen werden.

Diesem Versuch anschließend wurde die optimale Konzentration des zugegebenen Doxycyclin ermittelt. Dabei erwiesen sich 2 µg/ml Doxycyclin im Medium als ideale Endkonzentrationen, bei der die Zelllinien die höchste Transgen-Expression aufwiesen und keine toxischen Nebeneffekte festzustellen waren (Daten nicht gezeigt).

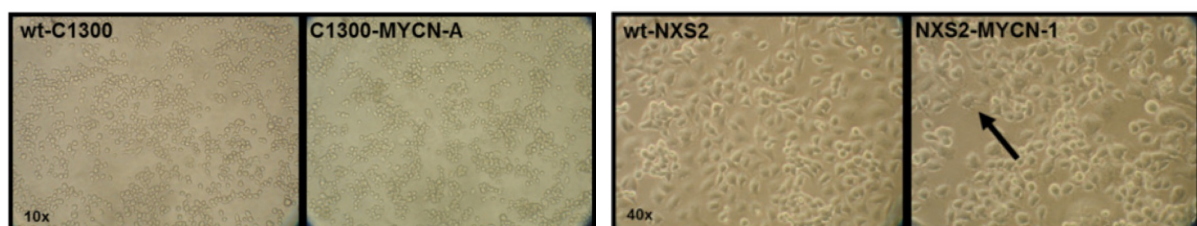
Da beide Zelllinien nach ungefähr sechsstündiger Inkubation mit 2 µg/ml Doxycyclin die höchste *MYCN*-Expression zeigten, wurden alle weiteren *in-vitro*-Versuche unter diesen Bedingungen durchgeführt.

#### 4.4 *In-vitro*-Charakterisierung der Zelllinien

Nach Auswahl der beiden Zelllinien NXS2-MYCN-1 und C1300-MYCN-A wurden weitere Untersuchungen zur *in-vitro*-Charakterisierung der Zelllinien durchgeführt, bevor sie schließlich für die *in-vivo*-Vakzinierungsstudie eingesetzt wurden.

##### 4.4.1 Zelluläre Veränderungen durch *MYCN*

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurden die äußerlichen Auswirkungen der stabilen Integration des Transgens und die damit verbundene Expression von *MYCN* auf die Zelllinien C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 im Vergleich zu den wt-Zelllinien untersucht (Abb. 4.4.1).



**Abb. 4.4.1: Morphologie der *MYCN*-Zelllinien.**

In den Abbildungen sind die wt-Zelllinien C1300 (links) und NXS2 (rechts) im Vergleich zu den stabil transfizierten C1300-MYCN-A- und NXS2-MYCN-1-Zellen abgebildet. Die einzigen beobachteten Unterschiede zwischen den jeweiligen Zellpaaren sind kleine Zell-Ausläufer bei einigen NXS2-MYCN-1-Zellen (Pfeil). Bei den C1300-Zellpaaren wurden keine Unterschiede festgestellt.

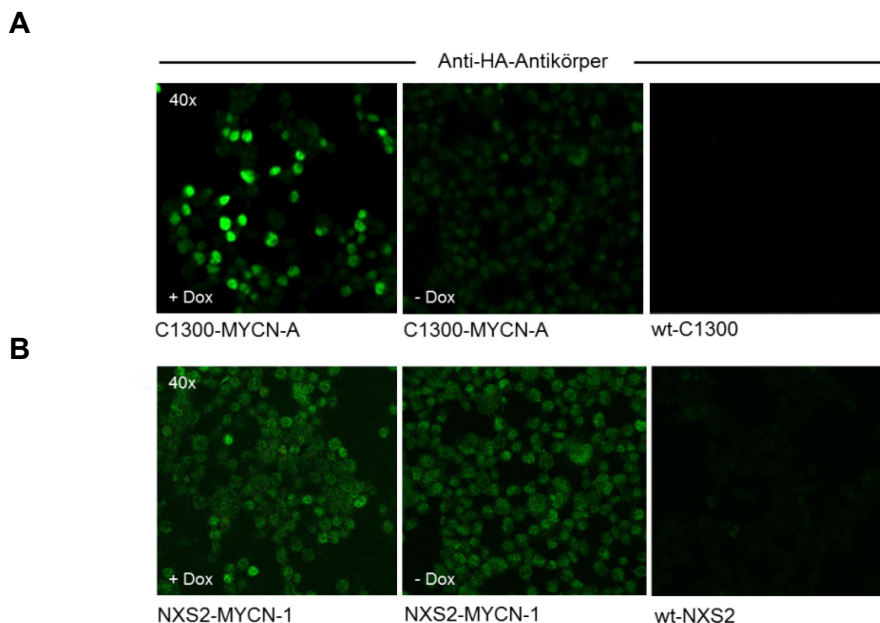
Die Aufnahmen wurden mit einer 10- (C1300) und 40fachen (NXS2) Vergrößerung gemacht.

Bei Betrachtung der MycN-überexprimierenden Zelllinien gegenüber den jeweiligen wt-Zellen wurden kaum Unterschiede festgestellt. Bei wenigen NXS2-MYCN-1-Zellen waren

kleine Ausläufer, vergleichbar mit Filopodien, sichtbar (Abb. 4.4.1, rechts), die auch in wt-NXS2-Zellen hoher Zellpassagen beobachtet werden können. Bei den C1300-Zellpaaren wurden keine optisch sichtbaren Unterschiede festgestellt.

#### 4.4.2 Nachweis der intrazellulären Transgen-Expression mittels Immunfluoreszenz

Die Expression des MycN-HA-Proteins der Zellen wurde bereits mittels Western-Blot nachgewiesen (Abschnitt 4.3.4), zusätzlich erfolgte der Expressions-Nachweis auf intrazellulärer-Ebene mit Hilfe von Immunfluoreszenz. Dafür wurden die jeweiligen Transfektanten im nativen und induzierten Zustand fixiert und die Transgen-Expression mit Hilfe eines FITC-markierten HA-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 4.4.2).



**Abb. 4.4.2: Nachweis des MycN-HA-Proteins mittels intrazellulärer Fluoreszenzfärbung.**

Zum Nachweis der intrazellulären Expression des MycN-HA-Proteins wurden die jeweiligen wt-Zellen und Transfektanten, unbehandelte und mit Doxycyclin behandelte (6h), fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-markierten HA-Antikörper durchgeführt. Für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurde eine 40fache Vergrößerung gewählt.

- A) Nachweis der Expression von MycN-HA in C1300-MYCN-A Zellen ohne und nach 6h Inkubation mit 2 µg/ml Doxycyclin. Als Negativ-Kontrolle wurde die wt-C1300-Zelllinie verwendet.
- B) Nachweis der MycN-HA-Expression in NXS2-MYCN-1 Zellen ohne und nach 6h Inkubation mit 2 µg/ml Doxycyclin. Als Negativ-Kontrolle wurde die wt-NXS2-Zelllinie verwendet.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung korrelierten mit den Resultaten der Western-Blot-Analysen. Auch in diesem Versuch wies NXS2-MYCN-1 bereits im nativen Zustand

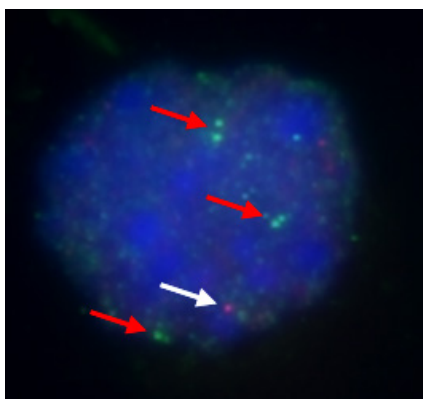
eine deutlich sichtbare Expression des Transgens auf, die durch Induktion mit Doxycyclin kaum sichtbar zunahm (**B**). In den wt-NXS2-Zellen wurde kein MycN-HA detektiert.

Die C1300-MYCN-A-Zellen zeigten im unbehandelten Zustand nur eine geringe basale Expression des Transgens, die aber durch Induktion mittels Doxycyclin deutlich zunahm (+Dox) (**A**). In der wt-C1300-Kontrolle konnte kein MycN-HA detektiert werden.

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung wurde somit die intrazelluläre Expression des Transgens in beiden Zelllinien nach Induktion nachgewiesen, wobei NXS2-MYCN-1 bereits unbehandelt eine hohe basale MycN-HA-Expression zeigte.

#### 4.4.3 Bestimmung der Anzahl integrierter Transgene mittels FISH

Anhand der vorangegangenen Experimente konnte die Integration des Transgen-tragenden Vektorsystems in das Genom der ausgewählten Transfektanten nachgewiesen werden. Die bisher generierten Daten warfen die Frage auf, wie viele Kopien des *GOI*-tragenden Plasmiden von den jeweiligen Zelllinien stabil aufgenommen wurden. Um diese Frage zu beantworten wurde mit Hilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) die Anzahl der integrierten Transgene untersucht, dabei wurden die Integrationsstellen mit fluoreszenzmarkierten *MYCN*-cDNA-spezifischen Sonden detektiert (Abb. 4.4.3) Die FISH wurde freundlicherweise von der AG Peter Ambros in Wien durchgeführt.



**Abb. 4.4.3: *MYCN*-spezifische FISH von C1300-MYCN-A.**

Mit C1300-MYCN-A-Zellen wurde eine FISH durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop. Kopien der *MYCN*-cDNA sind durch grüne Punkte sichtbar (rote Pfeile). Ein Kontroll-Gen zum Nachweis der Hybridisierung wurde mit einer roten Sonde markiert (weißer Pfeil).

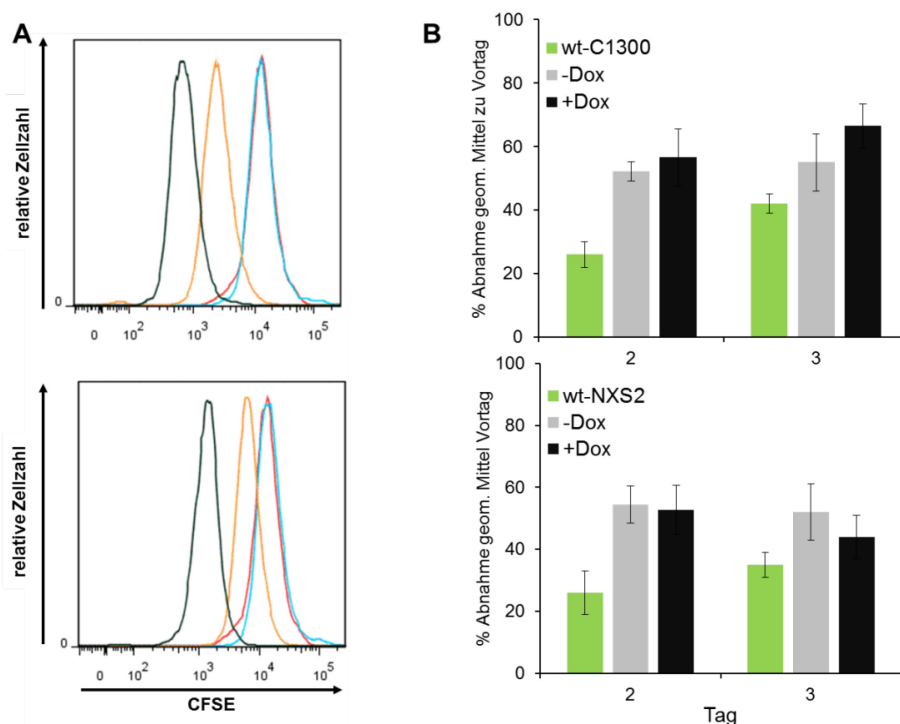
Wie der Abbildung 4.4.3 zu entnehmen ist, wurden bei C1300-MYCN-A mit Hilfe der FISH drei Kopien der *MYCN*-cDNA im Genom detektiert. Zwar ist die Anzahl mit drei *MYCN*-Kopien im Vergleich zu *MYCN*-amplifizierten Zellen gering (zum Vergleich Abb. 1.1B), aber durch die dem Transgenen vorgeschalteten starken CMV-Promotoren des verwendeten Vektorsystems, wird eine sehr hohe Genexpression nach Induktion ermöglicht.

Für NXS2-MYCN-1 konnten keine auswertbaren FISH-Bilder generiert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.4 MYCN beschleunigt die Proliferation der Transfektanten

Neben den morphologischen Veränderungen (Abschnitt 4.4.1) wurden bei den Transfektanten weitere Unterschiede im Vergleich zu den Ausgangszelllinien festgestellt. Beide *MYCN*-Zelllinien wiesen einen sehr hohen Medium-Verbrauch auf, so dass das Kulturmedium spätestens alle 48h erneuert werden musste; bei gleicher Zellzahl war ein Medium-Wechsel bei den wt-Zelllinien nur alle 72h nötig. Eine Ursache für diesen hohen Medium-Verbrauch könnte in einem veränderten Stoffwechsel liegen, bedingt durch einen gestörten Zellzyklus. So ist eine häufig beobachtete Eigenschaft von *MYCN*-amplifizierten NB-Zellen eine schnelle unkontrollierte Proliferation (Bell *et al.*, 2006).

Um die Proliferation zu untersuchen, wurde mit den Transfektanten und den jeweiligen wt-Zelllinien ein CFSE-Assay durchgeführt (Abschnitt 3.5.8). Dabei wurden die Zellen mit dem Farbstoff CFSE gefärbt, der bei Zellteilung äquivalent an die Tochterzellen abgegeben wird. Anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität kann dann das relative Wachstum der Zellen bestimmt werden (Abb. 4.4.4).



**Abb. 4.4.4: Relatives Zellwachstum der *MYCN*-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den wt-Zelllinien.**

Mit Hilfe eines CFSE-Assays wurde das relative Wachstum der Transfektanten (+Dox und -Dox) und wt-Zellen untersucht. Für den Versuch wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und anschließend die Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit Hilfe von Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von drei Tagen bestimmt. (n=3).

- A)** Für beide Zelllinien exemplarisches Beispiel der gemessenen CFSE-Färbungen mittels FACS. Bei diesem Versuch korreliert die CFSE-Fluoreszenzintensität invers mit dem Zellwachstum. Die Histogramme zeigen die Abnahme des CFSE-Signals von C1300-MYCN-A-Zellen (oberes Histogramm) sowie von wt-C1300-Zellen (unteres Histogramm) in Gegenwart und Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) über einem Zeitraum von 3 Tagen im Vergleich zur Mitomycin-behandelten Kontrolle.

- 
- Rot - CFSE-Intensität Mitomycin-behandelter Zellen nach drei Tagen.  
Blau - CFSE-Intensität gefärbter Zellen nach einem Tag.  
Orange - CFSE-Intensität gefärbter Zellen nach zwei Tagen.  
Dunkelgrün - CFSE-Intensität gefärbter Zellen nach drei Tagen.
- B)** Die berechnete prozentuale Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität des CFSE zum Vortag von C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 im Vergleich zu den jeweiligen wt-Zelllinien.

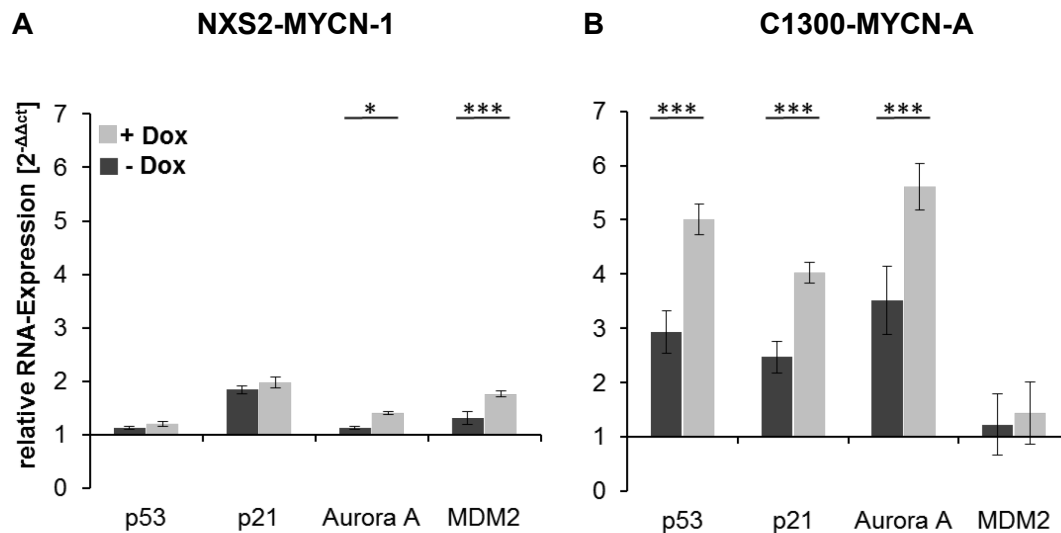
Mit Hilfe der CFSE-Färbung konnte eine stärkere Proliferation der stabil transfizierten Zellen im Vergleich zu den wt-Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei zeigten bereits die nativen C1300-MYCN-A-Zellen über dem gemessenen Zeitraum eine stärkere Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität (54%) im Vergleich zu wt-C1300 (25 bzw. 38%) und somit ein schnelleres Wachstum. Durch Zugabe von Doxycyclin und der damit verbundenen Expression von *MYCN* wurde die Proliferation nochmals erhöht, welche sich in einer täglichen Abnahme der gemessenen MFI von ca. 60% widerspiegelte.

Auch bei den nativen NXS2-MYCN-1-Zellen wurde eine verstärkte Proliferation im Vergleich zu wt-NXS2 beobachtet (Abnahme der MFI um ca. 50%), die aber im Gegensatz zu C1300-MYCN-A durch Induktion des Transgens nahezu unverändert blieb.

Zusammengefasst zeigten beide Transfektanten bereits unbehandelt eine schnellere Proliferation als die jeweilige wt-Zelllinie, wobei das Wachstum von C1300-MYCN-A, im Gegensatz zu NXS2-MYCN-1, durch Induktion des Transgens noch verstärkt wurde.

#### **4.4.5 *MYCN*-abhängige Expression Zellzyklus-relevanter Gene**

Nachdem gezeigt wurde, dass die stabile Integration des Transgens Auswirkung auf die Proliferation der Transfektanten hat, wurde nach Ursachen gesucht. Ein wichtiger Faktor, durch den ein beschleunigtes Zellwachstum hervorgerufen werden kann, ist der Einfluss des Onkogens *MYCN* auf die Expression Zellzyklus-relevanter Gene (siehe Abschnitt 1.4). Deswegen wurden die Expressionsunterschiede von p53, p21<sup>WAF1</sup>, Aurora A und MDM2, nach Induktion des Transgens, mit Hilfe einer SYBR Green q-PCR unter Verwendung Gen-spezifischer Primer durchgeführt (Abb. 4.4.5).



**Abb. 4.4.5: Genexpressionsanalyse der MYCN-Transfektanten.**

Mit Hilfe einer SYBR Green q-PCR, unter Verwendung von Gen-spezifischen Primern, wurden die Expressionsunterschiede von p53, p21<sup>WAF1</sup>, Aurora A und MDM2 zwischen den jeweiligen wt-Zelllinien (=1) und den Transfektanten mit und ohne Doxycyclin bestimmt. Dafür wurden die Zellen nativ oder mit 2 µg/ml Doxycyclin für 6h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ihre RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die SYBR Green q-PCR durchgeführt. Die relative RNA-Expression 2<sup>-ΔΔct</sup> wurde im Vergleich zu den jeweiligen wt-Zelllinien wt-NXS2 (A) und wt-C1300 (B) bestimmt. Als Referenzgene dienten 18s-RNA und GAPDH.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und die jeweilige Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Expressionsunterschiede zwischen wt-Zellen und mit Dox induzierten C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 waren alle, bis auf p53 bei NXS2 und MDM2 bei C1300, statistisch signifikant (nicht gezeigt). Die aufgeführten Signifikanzen beschreiben die statistischen Unterschiede zwischen den unbehandelten und mit Doxycyclin induzierten Transfektanten.

(\* = p < 0.05; \*\*\* = p < 0.001, *unpaired-Student's-t-Test*). (n=5).

Mit Hilfe der Daten aus der SYBR Green q-PCR wurde gezeigt, dass alle untersuchten Zielgene in den stabil transfizierten Zelllinien bereits ohne MYCN-Induktion erhöht exprimiert wurden. So zeigten NXS2-MYCN-1 (A) eine bis zu 0,8fach (p21<sup>WAF1</sup>) und C1300-MYCN-A (B) eine bis zu 2,5fach (Aurora A) erhöhte RNA-Expression im nativen Zustand im Vergleich zu den wt-Zellen. Insgesamt war die Veränderung der relativen RNA-Expression aller untersuchten Gene bei C1300-MYCN-A etwas höher als bei den NXS2-MYCN-1-Zellen.

Bei NXS2-MYCN-1 wurde vor Zugabe von Doxycyclin eine maximal um 0,8fach erhöhte Genexpression im Vergleich zur wt-Zelllinie gemessen. Durch die Induktion des Transgens nahmen die Unterschiede noch etwas zu. So stieg die Expression von MDM2 hoch signifikant von 0,28 auf 0,9 und von Aurora A signifikant von 0,17 auf 0,5. p21<sup>WAF1</sup> und p53 zeigten im unbehandelten Zustand eine um 0,2 (p53) bzw. 0,8fach (p21<sup>WAF1</sup>) erhöhte Expression, die nach Induktion auf das 0,3 (p53) bzw. 0,9fache (p21<sup>WAF1</sup>) gegenüber der wt-Zelllinie anstieg.

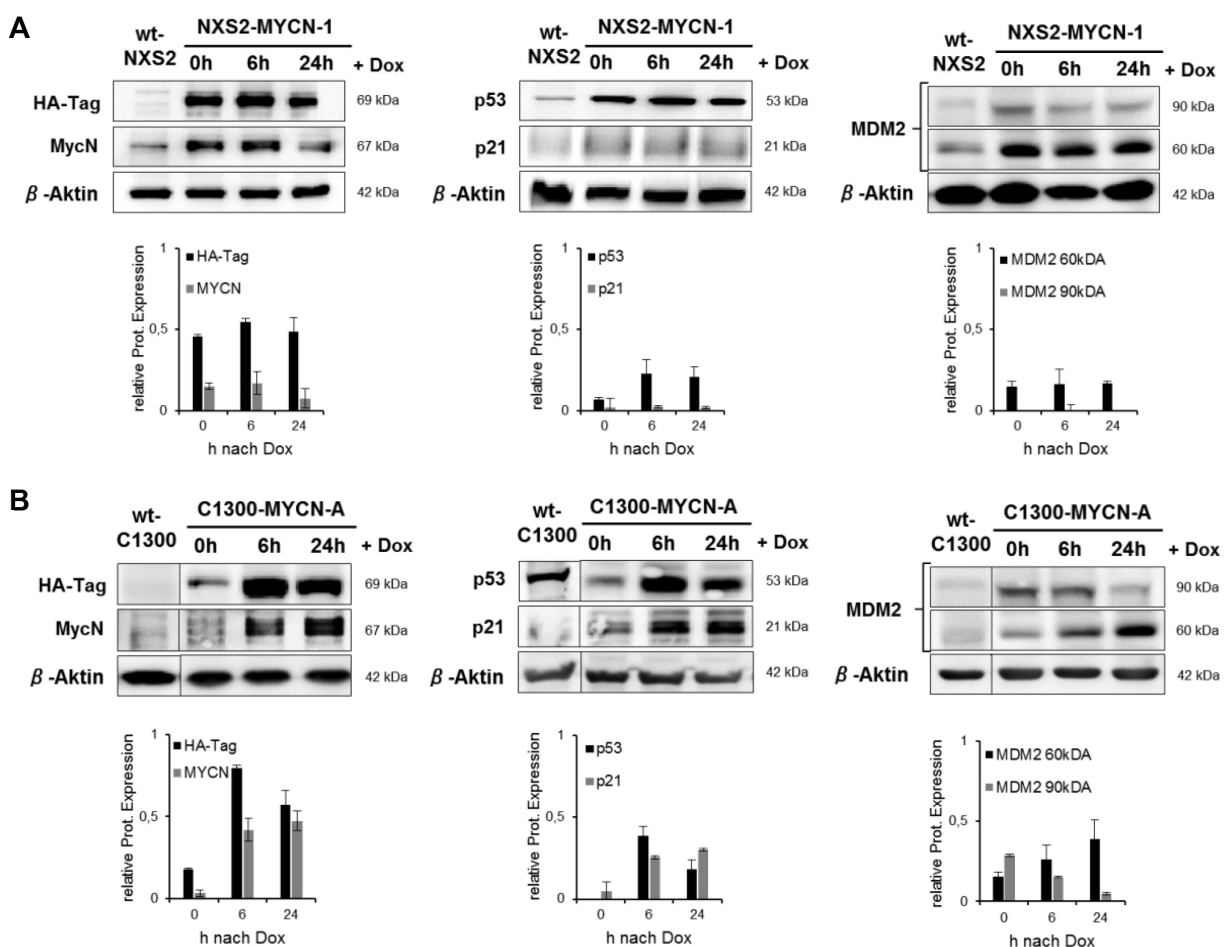
Bei C1300-MYCN-A waren die relativen Expressionsunterschiede bis zu 5mal höher (B) als in der wt-Zelllinie. Bereits die Kontroll-behandelten Zellen zeigten im Vergleich zur wt-Zelllinie hoch signifikante Unterschiede bei p53 (2fach), p21<sup>WAF1</sup> (1,5fach) und Aurora A (2,5fach). Nach Induktion durch Doxycyclin stieg die relative RNA-Expression der genannten



Gene hoch signifikant im Vergleich zum unbehandelten Transfektanten an. Bei MDM2 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Resultate dieser Untersuchung zeigten, dass die *MYCN*-Expression der Transfektanten deutliche Auswirkungen auf bekannte *MYCN*-Zielgene hat, die Ursache für die gesteigerte Proliferation sein könnten. Ferner wurde so die Funktionalität des Transgens bewiesen.

Da die Genexpression nicht mit der Proteinexpression korrelieren muss, wurde in einem weiteren Versuch die Proteinmenge der zuvor genannten Zielgene nach unterschiedlich langen Induktionszeiten untersucht. Dafür wurden Proteinlysate aus Doxycyclin- (6h und 24h) und unbehandelten Transfektanten sowie den wt-Zellen hergestellt und mit diesen Western-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 4.4.6).



**Abb. 4.4.6: Western-Blot-Analysen bekannter *MYCN*-Zielproteine.**

Für die Analyse der Proteinexpression beider genetisch modifizierten Zelllinien NXS2-MYCN-1 (**A**) und C1300-MYCN-A (**B**) wurden Proteinlysate unbehandelter, 6h und 24h mit Doxycyclin inkubierter Zellen hergestellt und 40 µg Gesamtprotein auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Der MDM2-Antikörper war spezifisch für das 90 kDa große aktive Protein und ein durch Caspase 3 geschnittenes MDM2-Fragment (60 kDa).

In den Balkendiagrammen unterhalb der jeweiligen Blots sind die relativen Mengenunterschiede der Proteine im Vergleich zu den wt-Zelllinien aufgeführt. Diese wurden anhand der Bandenintensität mittels ImageReady von Bio-Rad bestimmt. Alle Intensitäten wurden anhand der jeweiligen β-Aktin-Bande normalisiert. Die gezeigten Ergebnisse wurden aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.



Anhand der Western-Blot-Analyse wurde bei NXS2-MYCN-1 festgestellt, dass die p53- und MDM2-Expression bereits im nativen Zustand erhöht war und durch Zugabe von Doxycyclin unverändert blieb. Auffällig war bei diesen Zellen der hohe Anteil des 60 kDa großen MDM2-Spaltprodukts, welches häufig in Tumorzellen durch Caspase-3-Verdau von MDM2 zu finden ist (Pochampally *et al.*, 1998; Pochampally *et al.*, 1999). Das Protein p21<sup>WAF1</sup> war beim NXS2-MYCN-1 im Western-Blot nicht detektierbar, wodurch auf Proteinebene keine Unterschiede nach Induktion festgestellt wurden. Beim Vergleich der Proteinexpressionen (Abb.4.4.6) mit den RNA-Expressionen (Abb.4.4.5) war bei diesem Transfektanten eine Korrelation bei p53 und MDM2 festzustellen.

Bei C1300-MYCN-A nahm die Menge von MycN nach Zugabe von Doxycyclin deutlich zu (6 und 24h). In Korrelation mit der MycN-Expression stieg auch die von p53. Bei den Kontroll-behandelten C1300-MYCN-1 war im Gegensatz zu NXS2-MYCN-1 mehr aktives MDM2 nachweisbar und weniger des 60 kDa großen Spaltprodukts. Durch Induktion von *MYCN* änderte sich der Anteil des aktiven MDM2; Er nahm ab und im gleichen Maße stieg die Menge des degradierten MDM2-Produkts. In den wt-Zellen war kein MDM2 nachweisbar. Bei p21<sup>WAF1</sup> war in Kontroll-behandelten C1300-MYCN-A eine leichte Erhöhung im Vergleich zur wt-C1300-Zelllinie festzustellen, die nach 6h Induktion ihr Maximum erreichte.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Western-Blots und der Genexpressionen des C1300-Transfektanten (Abb. 4.4.5) konnte bei fast allen Untersuchten Genen eine Korrelation festgestellt werden. Wie auch in der q-PCR wurde bei allen untersuchten Proteinen eine Zunahme nach *MYCN*-Induktion beobachtet. Kleinere Unterschiede zwischen Genexpression und Proteinmenge lassen sich dabei durch posttranskriptionelle Modifikationen erklären.

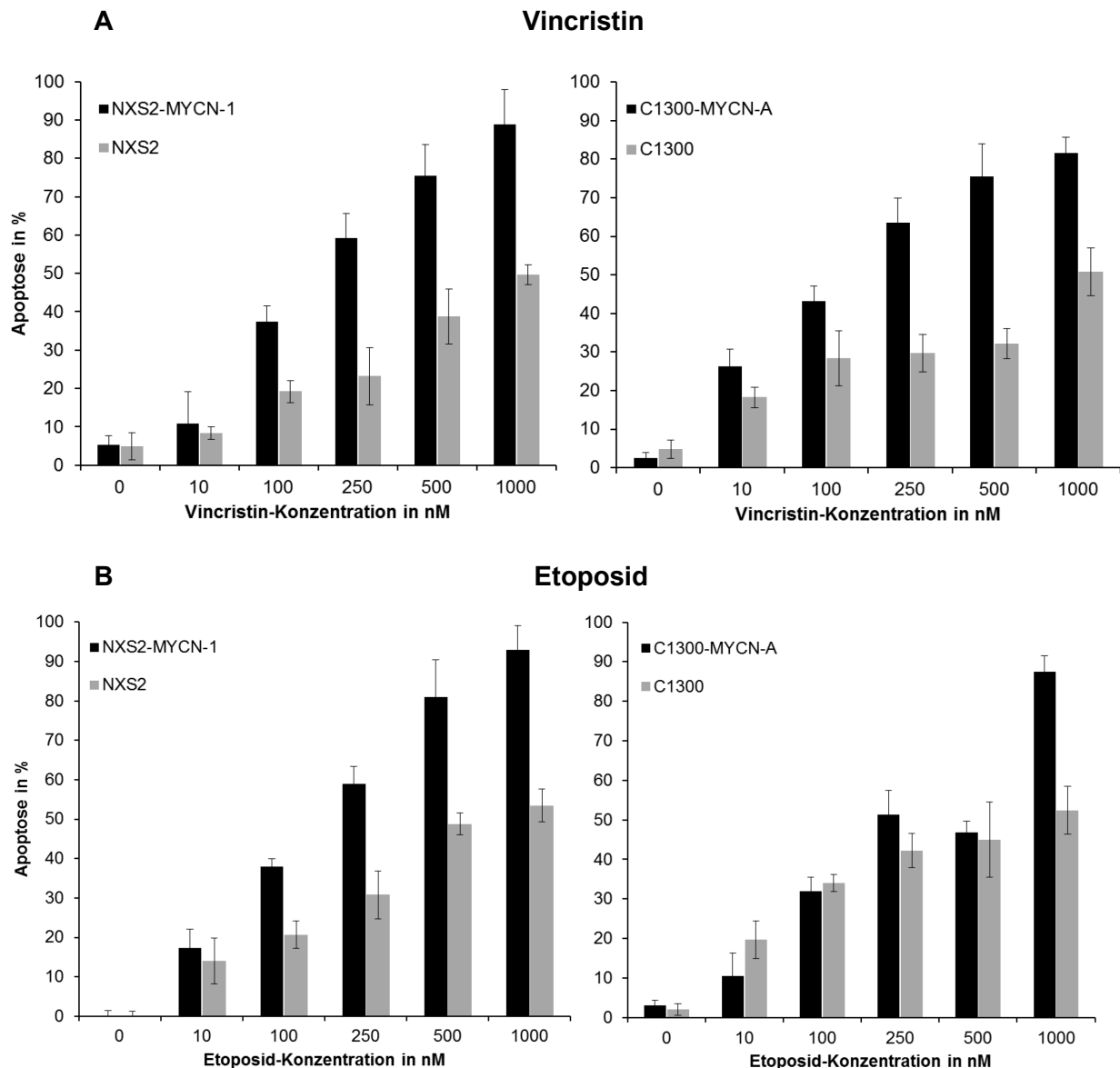
Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass das von den Transfektanten exprimierte MycN biologisch aktiv ist und direkten Einfluss auf Zellzyklus-relevante Gene hat, die Ursache für die gesteigerte Proliferation sein können.

#### 4.4.6 *MYCN*-induzierte Apoptose-Sensibilisierung

Ein typisches Merkmal *MYCN*-überexprimierender Zellen *in vitro*, ist ihre Sensibilisierung für durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose (Lutz *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2000). Da die hergestellten Zelllinien ebenfalls eine erhöhte *MYCN*-Expression aufwiesen, wurde ihre Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika mittels eines Annexin-V/PI-Apoptose-Assays untersucht.

Dafür wurden die zu untersuchenden Zellen wt-NXS2, wt-C1300 und die jeweilige stabil transfizierte Zelllinie mit und ohne Zugabe von Doxycyclin für 72h mit steigenden Konzentrationen von Vincristin oder Etoposid inkubiert (Jackson, Jr. and Bender, 1979;

Fukumi *et al.*, 2000). Anschließend wurde der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mit einer Annexin V-PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4.4.7).



**Abb. 4.4.7: Chemotherapeutika-induzierte Apoptose der Transfektanten nach MYCN-Induktion.**

Die untersuchten Zellen wurden 72h mit steigenden Konzentrationen von Vincristin (A) und Etoposid (B) inkubiert und anschließend wurde eine Annexin V-PI-Färbung durchgeführt. Mit Hilfe von Durchflusszytometrie wurde die prozentuale Apoptoserate bestimmt. Gezeigt sind die Ergebnisse der mit 2 µg/ml Doxycyclin behandelten Transfektanten (schwarz) und der jeweiligen wt-Zelllinien (grau). Um toxische Wirkungen von Doxycyclin auszuschließen, wurden die wt-Zellen ebenfalls mit 2 µg/ml Doxycyclin behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (n=3).

Bei dieser Untersuchung zeigten die neu etablierten Zelllinien mit steigenden Chemotherapeutika-Konzentrationen eine zunehmend höhere Apoptoserate als die wt-Zelllinien. Wurde Vincristin zur Behandlung eingesetzt, betrug die Konzentration des

Chemotherapeutikums, bei der 50% aller NXS2-MYCN-1-Zellen apoptotisch waren, 190nM und 530nM für wt-NXS2.

Die Unterschiede bei den C1300-Paaren waren ähnlich hoch; hier Betrug die Vincristin-Konzentration bei der die Hälfte aller Zellen tot waren 230nM bei C1300-MYCN-A (+Dox) und 910nM bei der wt-Zelllinie.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Behandlung mit Etoposid. Bei diesem Therapeutikum betrugen die Konzentrationen bei denen 50% der Zellen apoptotisch waren, 210nM für NXS2-MYCN-1, 190nM bei C1300-MYCN-A und für die beiden wt-Zelllinien 990nM.

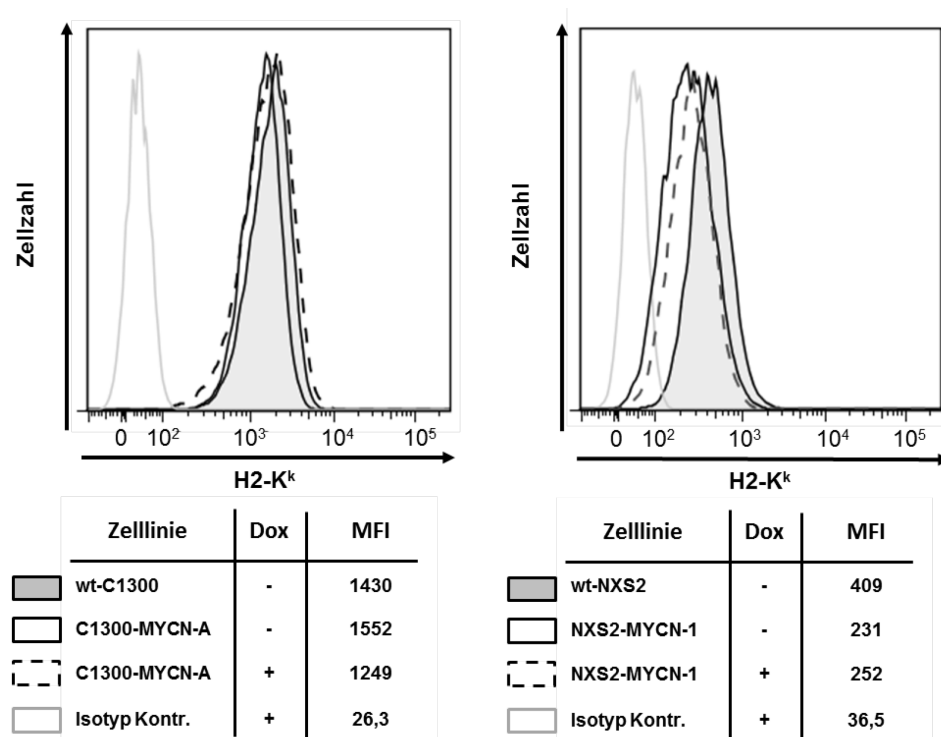
Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten also eine deutliche Apoptose-Sensibilisierung der *MYCN*-exprimierenden Transfektanten für Chemotherapeutika-induzierter Apoptose.

#### 4.4.7 Einfluss von *MYCN* auf die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen

Das Neuroblastom gilt als schwach immunogener Tumor. Begründet wird dies durch eine von *MYCN* hervorgerufene reduzierte Expression von NF- $\kappa$ B, die zu einer Verminderung der im Endoplasmatischen Retikulum befindlichen Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2 führt (Forloni *et al.*, 2010). Da diese unter anderem für die Generierung von MHC-Klasse-I-Bindepeptiden verantwortlich sind, nimmt man an, dass gerade Neuroblastome mit *MYCN*-Amplifikation eine geringe MHC-Expression aufweisen und eine CTL-vermittelte Immunantwort kaum zu erzielen ist.

Deshalb wurde, bevor die Klonen Anwendung in den *in-vivo*-Vakzinierungsversuchen fanden, die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle H2-K<sup>k</sup> auf der Zelloberfläche der Transfektanten vor und nach *MYCN*-Induktion untersucht. Damit sollte gezeigt werden, dass in den geplanten Mausmodellen H2-K<sup>k</sup> in ausreichender Menge exprimiert wird und eine mögliche Erkennung durch CTLs gewährleistet ist.

Für den Versuch wurden die jeweiligen wt-Zellen und unbehandelte, als auch mit Doxycyclin behandelte Transfektanten mit einem FITC-markierten H2-K<sup>k</sup>-Antikörper angefärbt. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (Abb. 4.4.8).



**Abb. 4.4.8: Bestimmung der H2-K<sup>k</sup>-Präsentation auf der Zelloberfläche der Transfektanten.**

Zur Bestimmung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den wt-Zellen und den stabil transfizierten Zellen (mit und ohne Dox) wurde eine FACS-Färbung mit einem FITC-markierten H2-K<sup>k</sup>-Antikörper durchgeführt. Der Anteil der MHC-Moleküle wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle bestimmt

Wie den Ergebnissen zu entnehmen, exprimierten die wt-C1300- und C1300-MYCN-A-Zellen, unabhängig von der *MYCN*-Induktion, eine hohe Anzahl des MHC-Moleküls H2-K<sup>k</sup> auf ihrer Zelloberfläche. Eine Korrelation zwischen *MYCN*-Expression und Abnahme der MHC-Klasse-I-Präsentation war bei diesen Zellen nur im geringen Maße erkennbar (1552 zu 1249 MFI).

Bei den NXS2-Zellen wurde insgesamt eine deutlich niedrigere mittlere Fluoreszenzintensität gemessen, die auf eine geringere H2-K<sup>k</sup>-Expression schließen ließ. Der MFI bei den wt-NXS2-Zellen betrug 409 und bei NXS2-MYCN-1 231. Ursache für die niedrige gemessene MFI beim Transfektanten könnte die oben beschriebene inverse Korrelation zwischen hoher *MYCN*-Expression (hohe basale Expression des Transgen) und dadurch verringerte MHC-Präsentation sein.

Die Induktion des Transgens durch Doxycyclin wirkte sich nicht weiter auf die gemessene MFI aus.

Insgesamt wurde auf allen Zellen das MHC-Molekül H2-K<sup>k</sup> nachgewiesen, wobei sich die Präsentationsdichte (anhand des MFI) zwischen den C1300- und NXS2-Zellen deutlich unterschied.

Neben H2-K<sup>k</sup> wurden weitere immunologisch relevante Oberflächenmarker, wie die NKG2D-Liganden RAE1 und H60, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei konnten aber keine durch *MYCN* hervorgerufenen Veränderungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.5 Etablierung und Charakterisierung der Transfektanten *in vivo*

Nachdem die hergestellten *MYCN*-exprimierenden NXS2- und C1300-Transfektanten *in vitro* charakterisiert wurden, folgte die Etablierung dieser Zellen *in vivo*. Dabei wurde das Wachstumsverhalten injizierter Primärtumoren und die Bildung von Metastasen im Vergleich zu den jeweiligen wt-Zellen untersucht. Gleichzeitig wurde mit Hilfe von Paraffin- bzw. Gefrierschnitten die Expression von *MYCN* in metastasierten Organen (C1300-MYCN-A) und isolierten Primärtumoren (NXS2-MYCN-1) aus mit Doxycyclin genährten Tieren nachgewiesen.

##### 4.5.1 Untersuchung der Tumorigenität von C1300-MYCN-A in A/J-Mäusen

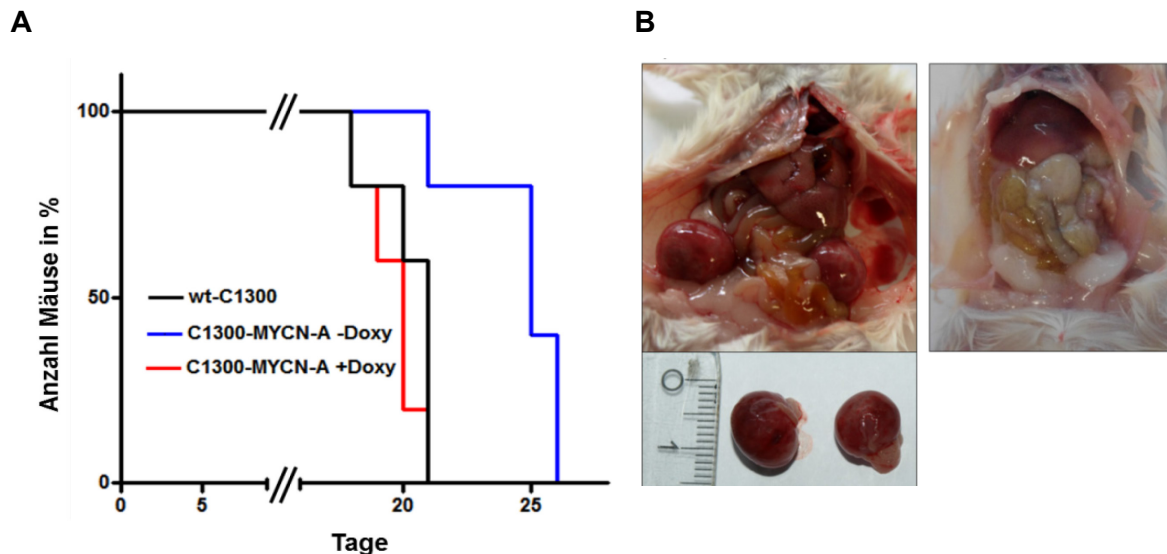
Wt-C1300-Zellen werden in Verbindung mit A/J-Mäusen meist als Metastasierungsmodell verwendet, bei der die Zellen intravenös appliziert werden, wie auch die neue Zelllinie C1300-MYCN-A.

Für die Immunisierungsexperimente war bei den *in-vivo*-Versuchen eine hohe *MYCN*-Expression in den Metastasen entscheidend, die in einem ersten Versuch nachgewiesen werden sollte. Parallel dazu wurde untersucht, ob die Integration des Transgens und dessen Expression Auswirkung auf das Metastasierungsverhalten der Zellen hat.

Zu diesem Zweck wurden fünf Mäusen  $3 \times 10^6$  wt-C1300-Zellen und zehn Mäusen  $3 \times 10^6$  C1300-MYCN-A-Zellen i.v. injiziert. Von der C1300-MYCN-A-Gruppe wurden fünf Tiere im Verlauf mit Doxycyclin-haltigem Wasser (2 g/l Dox, 10% Saccharose) und die anderen fünf mit Saccharose-haltigem Wasser genährt. Nach 21-30 Tagen, je nach gesundheitlichem Zustand, wurden die Tiere getötet, der Metastasierungsgrad bestimmt und metastasierte Organe in Gefriermedium fixiert.

Bei diesem Versuch wurde festgestellt, dass die Tiere, denen C1300-MYCN-A injiziert worden war und die mit Doxycyclin genährt wurden, ähnlich schnell Metastasen bildeten wie die wt-C1300-Zelllinie. Tiere, denen ebenfalls der Transfektant appliziert wurde, die jedoch Doxycyclin frei genährt wurden, entwickelten erst 6-7 Tage später Metastasen (Abb.4.5.1A). Nach Sezierung aller Tiere am Ende des *in-vivo*-Versuchs wurde bei Mäusen, denen C1300-MYCN-A injiziert worden war, ein anderes Metastasierungsmuster beobachtet als bei denen der wt-C1300-Gruppe (Abb.4.5.1B). Die Tiere entwickelten ausschließlich

Metastasen in den Ovarien und ganz vereinzelt in den Lymphknoten. Im Vergleich dazu zeigten die wt-C1300-Zellen in A/J-Mäusen die typischen Metastasierungen in Leber, Nieren und den Ovarien.



**Abb. 4.5.1: Ereignisfreie Überlebensrate und Metastasenbildung von A/J-Mäusen nach intravenöser C1300-MYCN-A-Tumorinjektion.**

Drei Mausgruppen á fünf A/J-Mäusen wurden entweder  $3 \times 10^6$  wt-C1300- (5 Tiere) oder C1300-MYCN-A-Zellen (10 Tiere) intravenös injiziert. Von den Tieren, denen der Transfektant injiziert wurde, erhielten fünf Doxycyclin im Trinkwasser, die anderen wurden nur mit Saccharose-haltigem Wasser genährt. Im Verlauf des Experimentes wurde die Gesundheit der Tiere in regelmäßigen Abständen kontrolliert; erkrankte Tiere wurden getötet. Anschließend wurde der Metastasierungsgrad der Tiere dokumentiert.

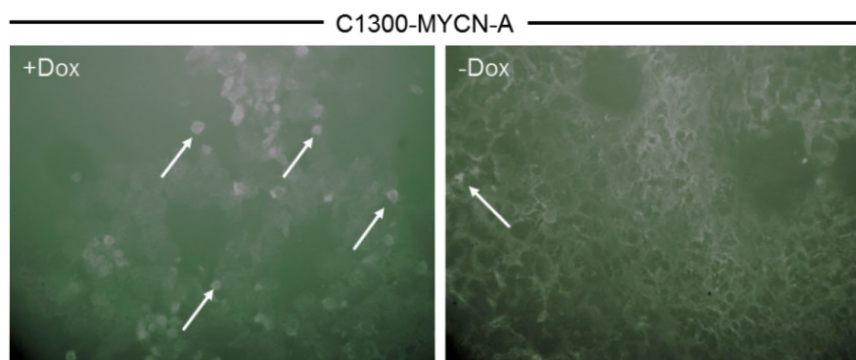
- A)** Gezeigt ist eine Kaplan-Mayer-Kurve in der die Tage bis zur Erkrankung/Tötung einzelner Mäuse in Prozent aufgeführt sind.
- B)** Die Abbildung zeigt die Metastasierungen einer Maus der Gruppe C1300-MYCN-A nach 25 Tagen (links). Zu sehen sind die stark metastasierten Ovarien in der Maus (oben) und darunter die aus der Maus heraus isolierten Ovarien. Das rechte Bild zeigt zum Vergleich eine unbehandelte gesunde Maus als Kontrolle. Die Abbildung B ist exemplarisch für alle mit C1300-MYCN-A-Tumor injizierten Tiere, die das gleiche Metastasierungsmuster aufwiesen.

Durch das neue Metastasierungsmuster war eine Auswertung anhand des bewährten *Staging Systems* nicht mehr möglich (Abschnitt 3.7.3), weshalb ein neues vorgeschlagen wurde. Nach diesem System wurde der Grad der Metastasierung anhand der Anzahl der befallenen Organe und dem Gewicht der metastasierten Ovarien festgelegt (siehe Tabelle 4.5.1).

Tab. 4.5.1: *Staging System* zur Bestimmung des Metastasierungsgrades nach C1300-MYCN-A-Injektion.

Metastasierungsgrad	Anzahl befallener Organe	Gewicht Ovarien (g)
<b>1</b>	1 (nur ein Ovar)	$\geq 0,5$
<b>2</b>	2 (beide Ovarien)	$\geq 0,5$
<b>3</b>	beide Ovarien und weitere Organe	$< 0,5$

Die metastasierten Organe wurden nach ihrer Auswertung in Gefriermedium fixiert. Später wurden Gefrierschnitte angefertigt, um die *MYCN*-Expression in den Metastasen nachzuweisen. Die Schnitte von den unterschiedlich genährten Tieren (+Dox; -Dox) wurden auf Objektträger fixiert und die Expression des Transgens mit Hilfe eines HA-Antikörpers nachgewiesen (Abb.4.5.2).



**Abb. 4.5.2: *MYCN*-HA-Expression in metastasierten Ovarien aus Mäusen nach i.v.-Injektion von C1300-MYCN-A.**

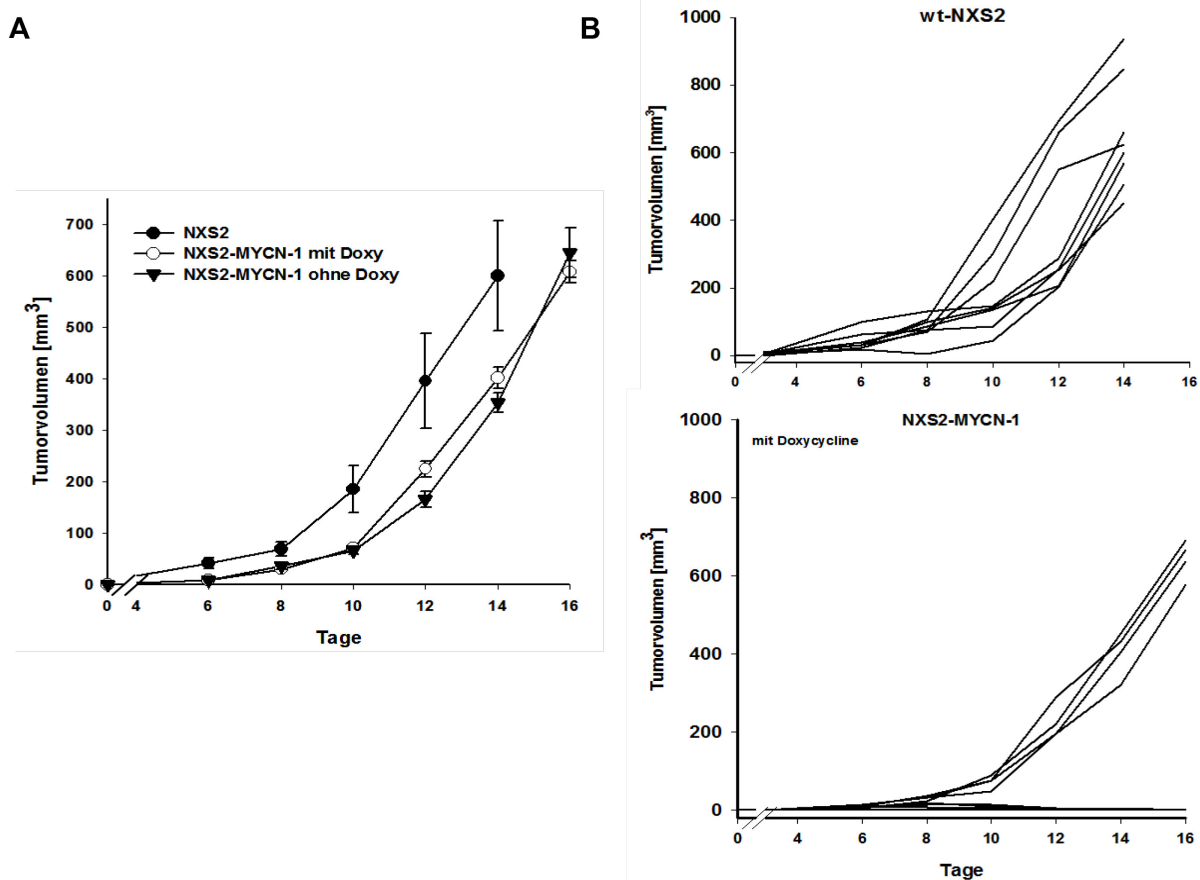
Jeweils 5 A/J-Mäusen wurden  $3 \times 10^6$  C1300-MYCN-A-Tumorzellen i.v. injiziert. Erkrankte Tiere wurden getötet, sezziert und die metastasierten Ovarien eingefroren. Aus den Ovarien wurden Gefrierschnitte angefertigt und die *MYCN*-HA-Expression mit Hilfe eines FITC-markierten HA-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. In der linken Aufnahme (+Dox) ist ein Schnitt eines Ovars einer mit Doxycyclin genährten Maus, in der rechten einer mit Wasser genährten abgebildet. *MYCN*-HA-positive Zellen sind mit weißen Pfeilen markiert. Die Aufnahmen wurden mit einer 40fachen Vergrößerung gemacht und sind exemplarisch für weitere durchgeführte Färbungen.

Anhand der Gefrierschnitte wurde in den Metastasen der mit Doxycyclin behandelten Tiere eine hohe *MYCN*-HA-Expression nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Tumoren der ausschließlich mit Saccharose-haltigem Wasser genährten Tiere keine bzw. nur eine sehr geringe Expression des Transgens. Somit wurde gezeigt, dass die injizierten Tumorzellen Metastasen in den Ovarien hervorrufen und die Induzierung des Transgens mit Hilfe von Doxycyclin-haltigem Trinkwasser auch *in vivo* möglich ist.

#### 4.5.2 Untersuchung der Tumorigenität von NXS2-MYCN-1 in A/J-Mäusen

Auch die Zelllinie NXS2-MYCN-1 wurde zunächst auf ihre Tumorigenität und *MYCN*-Expression *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden 24 Mäuse in drei Gruppen á acht Tiere aufgeteilt ( $n=8$ ). Einer Gruppe wurden  $4 \times 10^6$  wt-NXS2 und den anderen  $4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1 subkutan injiziert, wobei anschließend nur eine Gruppe mit Doxycyclin-haltigem Wasser (2 g/l Dox, 10% Saccharose) genährt wurde.

Nach Injektion der Tumorzellen wurde zunächst das Primärtumorwachstum in den A/J-Mäusen bis zu einem Volumen von  $600 \text{ mm}^3$  im Abstand von zwei Tagen gemessen und protokolliert (Abb. 4.5.3). Erreichten die Tumoren einer Gruppe das entsprechende Volumen, wurden sie operativ unter Narkose der Mäuse entfernt und in Formalin fixiert.



**Abb. 4.5.3: Primärtumorwachstum von wt-NXS2 und NXS2-MYCN-1 in A/J-Mäusen.**

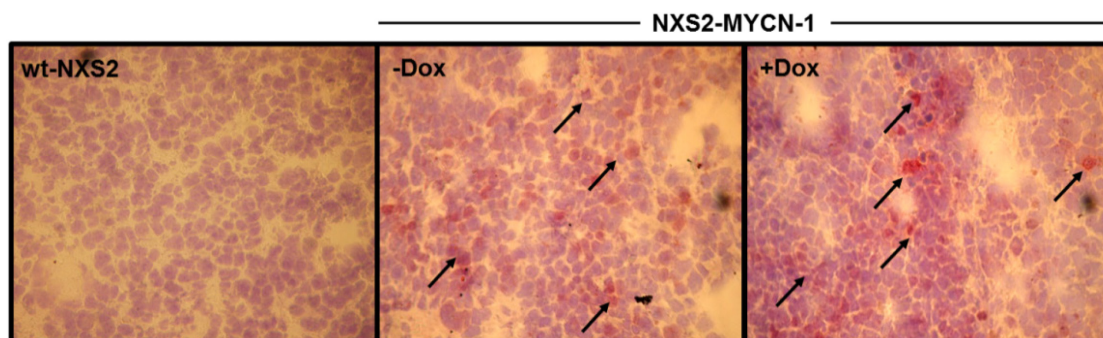
Drei Gruppen á 8 A/J-Mäusen wurden  $4 \times 10^6$  Tumorzellen (wt-NXS2 oder NXS2-MYCN-1) subkutan injiziert. Das Primärtumorwachstum wurde ab Tag 6 jeden zweiten Tag gemessen und protokolliert. Bei Erreichen eines Tumorvolumens von  $600 \text{ mm}^3$  wurde der Versuch der entsprechenden Gruppe beendet, die Tumoren entfernt und in Formalin fixiert. Die Mäuse, die mit Doxycyclin genährt wurden, erhielten 2 g/l Doxycyclin und 10% Saccharose im Trinkwasser.

- A)** Im Graphen sind die gemittelten Tumorvolumina der jeweiligen Gruppen aufgeführt. Es wurden nur die Tumoren miteinbezogen, die angewachsen waren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler.
- B)** In der Abbildung ist das Wachstum einzelner Tumoren der Gruppen wt-NXS2 (oben) und NXS2-MYCN-1 (unten) mit Doxycyclin aufgeführt. ( $n=8$ ).



Während dieses Versuchs entwickelten nur die Hälfte der Mäuse denen NXS2-MYCN-1-Zellen injiziert wurden Primärtumoren (Abb. 4.5.3.B). Dabei zeigten die manifestierten NXS2-MYCN-1-Tumoren ein, unabhängig von der Gabe von Doxycyclin, verzögertes aber vergleichbares exponentielles Tumorstwachstum wie die wt-NXS2-Zelllinie (Abb. 4.5.3.A).

Zur Untersuchung der MYCN-HA-Expression im Tumorgewebe wurden aus den in Formalin gelagerten Primärtumoren Paraffinschnitte angefertigt und eine immunhistochemische Färbung (IHC) durchgeführt. Hierzu wurde der HA-Tag im Fusionsprotein mit einem HA-Tag-Antikörper markiert und die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt (Abb. 4.5.4).



**Abb. 4.5.4: MYCN-HA-Expression in Primärtumoren von NXS2-MYCN-1-Zellen.**

NXS2-MYCN-1-Zellen wurden A/J-Mäusen subkutan injiziert. Dabei erhielt eine Gruppe Doxycyclin-haltiges H<sub>2</sub>O (2 g/l Dox, 10% Saccharose) und eine andere Saccharose-haltiges Wasser. Bei einem Volumen von 600 mm<sup>3</sup> wurden die Primärtumoren aus den Mäusen entfernt und in Formalin fixiert. Anschließend wurden die Tumoren entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesen wurden Schnitte angefertigt und das Fusionsprotein MycN-HA mittels HA-Antikörper und Hämatoxylin-Gegenfärbung nachgewiesen. Schwarze Pfeile markieren MYCN-HA-positive Zellen. Diese Bilder sind exemplarisch für weitere durchgeführte Färbungen. Die Aufnahmen wurden mit einer 40fachen Vergrößerung gemacht.

**Links:** Tumorschnitt von wt-NXS2 aus einer mit Doxycyclin-haltigem Wasser genährten Maus;

**Mitte:** Tumor von NXS2-MYCN-1 aus einer ausschließlich mit Wasser genährten Maus;

**Rechts:** Tumor von NXS2-MYCN-1 aus einer mit Doxycyclin haltigem Wasser genährten Maus.

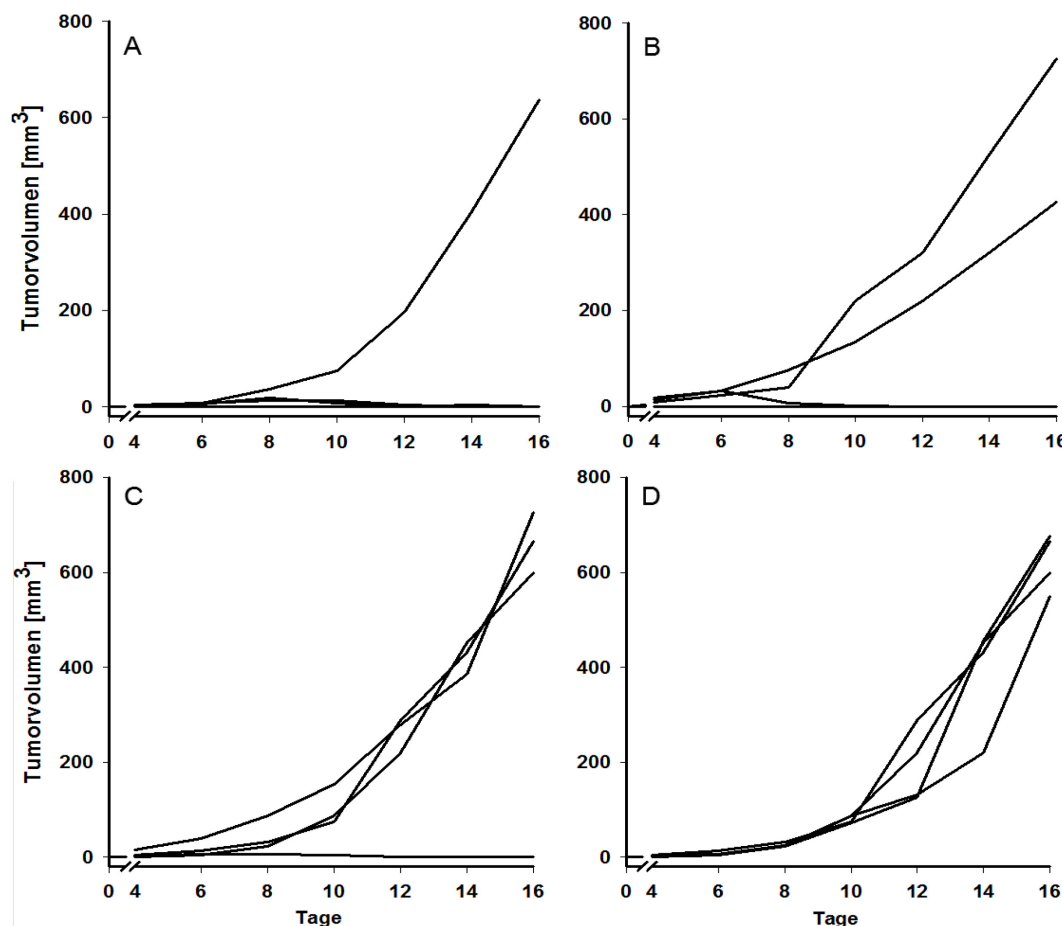
Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wurde MycN-HA in den Primärtumoren von NXS2-MYCN-1-Zellen unabhängig von Doxycyclin in vergleichbarer Menge exprimiert. Aus diesem Grund wurde in allen folgenden *in-vivo*-Versuchen mit dieser Zelllinie auf eine Mausgruppe mit Doxycyclin-haltigem Trinkwasser verzichtet.

Da in diesem Mausmodell neben dem Primärtumorstwachstum die spontane Metastasierung einen entscheidenden Faktor für die Auswertung der *in-vivo*-Versuche darstellt, wurden die operierten Tiere im weiteren Verlauf täglich beobachtet. Sobald sie äußerlich sichtbar erkrankten wurden sie getötet und sezziert. Dabei wurden ausschließlich Metastasen in Tieren gefunden, bei denen sich zuvor Primärtumoren manifestiert hatten. Diese Tiere zeigten das gleiche Metastasierungsmuster wie es bei C1300-MYCN-A-Zellen beobachtet wurde. Die untersuchten Tiere entwickelten ausschließlich Metastasen in den Ovarien (Abb.

4.5.7A). Im Vergleich dazu metastasierten wt-NXS2-Zellen in A/J-Mäusen auf der Leber, den Nieren, Nebennieren, Lymphknoten und Ovarien (Abb. 4.5.7C).

### 4.5.3 Passagieren von NXS2-MYCN-1 in A/J-Mäusen

Da sich im ersten *in-vivo*-Experiment nur die Hälfte aller injizierten Tumoren der NXS2-MYCN-1-Zellen manifestierten, wurde die Tumorigenität der MYCN-modifizierte Zellen durch mehrfaches passagieren in A/J-Mäuse erhöht. Zu diesem Zweck wurden vier A/J-Mäusen  $4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1-Zellen subkutan injiziert und angewachsene Tumoren nach 16 Tagen operativ entfernt. Aus den Primärtumoren wurden Zellen isoliert und *in vitro* expandiert. Nach einer AB-Selektion mit Zeocin<sup>™</sup> und Blasticidin wurden die kultivierten Zellen erneut vier A/J-Mäusen subkutan injiziert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis alle Tiere Primärtumoren entwickelten (Abb.4.5.5).

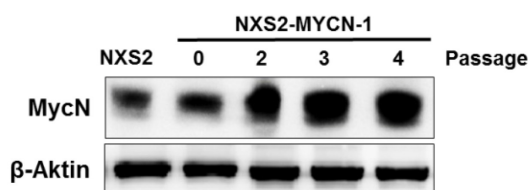


**Abb. 4.5.5: Primärtumorwachstum von NXS2-MYCN-1 nach mehrmaligem Passagieren in A/J-Mäusen.**

$4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1-Zellen wurden A/J-Mäusen subkutan injiziert. Primärtumoren wurden nach 16 Tagen entfernt und aus diesen Tumorzellen isoliert. Nach *in-vitro*-Kultivierung wurden diese Zellen erneut vier A/J-Mäusen injiziert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt, bis alle Tiere Primärtumoren bildeten. Abgebildet ist das Tumorwachstum aller injizierten Primärtumoren jeder Maus Passage (A= Passage 1, B= 2 etc.). (n=4).

Wie in Abbildung 4.5.5 gezeigt, nahm die Anzahl manifestierter Tumoren mit jeder Passage zu und nach der vierten Passage betrug die Anwachsrate 100%. Das Tumorstadium war dabei stets gleichbleibend und mit dem von wt-NXS2-Tumoren vergleichbar.

Zur Sicherstellung der MycN-Expression in den passagierten Zellen wurden anschließend Proteinlysate aus den Zellen jeder einzelnen Passage angefertigt und mit diesen Western-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 4.5.6).

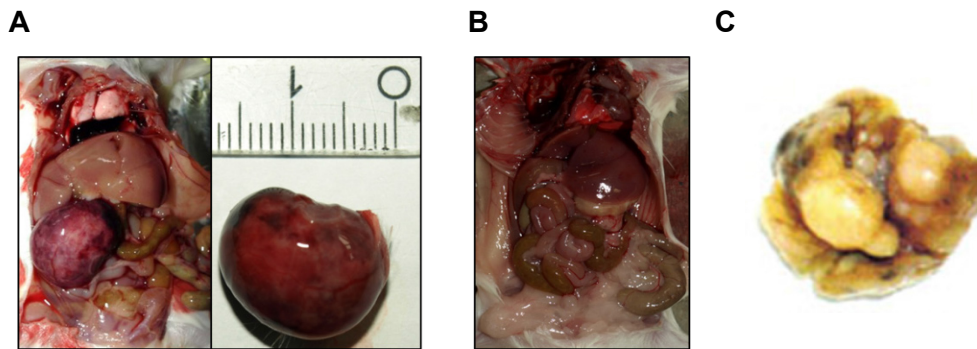


**Abb. 4.5.6: Nachweis der MycN-Expression in Primärtumoren nach mehrmaligen *in-vivo*-Passagen in A/J-Mäusen.**

$4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1-Zellen wurden A/J-Mäusen subkutan injiziert. Primärtumoren wurden nach 16 Tagen entfernt. Aus den Tumoren isolierte Zellen wurden *in vitro* unter Selektionsdruck für 20 Tage kultiviert und erneut A/J-Mäusen injiziert. Dieser Schritt wurde viermal wiederholt. Nach jeder *in-vitro*-Passage wurden Proteinlysate aus den kultivierten Zellen hergestellt. Von diesen wurde 40 µg Gesamtprotein für die SDS-PAGE eingesetzt. Der Nachweis des Transgenproduktes erfolgte mit einem MycN-spezifischen Antikörper.

Der Western-Blot zeigte, dass die passagierten Zellen eine hohe MYCN-Expression aufwiesen, die mit jeder Passage sogar zunahm.

Während aller *in-vivo*-Versuche wurde, nach Entfernung der Primärtumoren, die spontane Metastasierung der NXS2-MYCN-1-Zellen beobachtet und protokolliert. Alle Tiere entwickelten, wie auch die der wt-NXS2 Kontrollgruppe, nach etwa 26 bis 32 Tagen Metastasen. Wie aber bereits beim C1300-MYCN-A Modell beobachtet, entwickelten die Mäuse denen NXS2-MYCN-1-Zellen injiziert wurden, vornehmlich Metastasen in den Ovarien und vereinzelt in den Lymphknoten und nicht wie wt-NXS2-Zellen in Leber und Nieren (Abb. 4.5.7).



**Abb. 4.5.7: Spontane Metastasierung in A/J-Mäusen nach NXS2-MYCN-1-Tumorinjektion.**

Insgesamt acht A/J-Mäusen wurden  $4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1-Zellen subkutan injiziert. Vier Tiere wurden mit Doxycyclin im Trinkwasser genährt (2 g/l Doxycyclin und 10% Saccharose). Nach ca. 14-16 Tagen wurden die entstandenen Primärtumoren operativ entfernt. Im weiteren Verlauf des Experimentes wurden die Tiere regelmäßig kontrolliert. Erkrankte Tiere wurden getötet und der Metastasierungsgrad der Tiere dokumentiert. Abbildung A ist exemplarisch für alle Tiere denen NXS2-MYCN-1-Zellen injiziert wurden und ein vergleichbares Metastasierungsmuster aufwiesen.

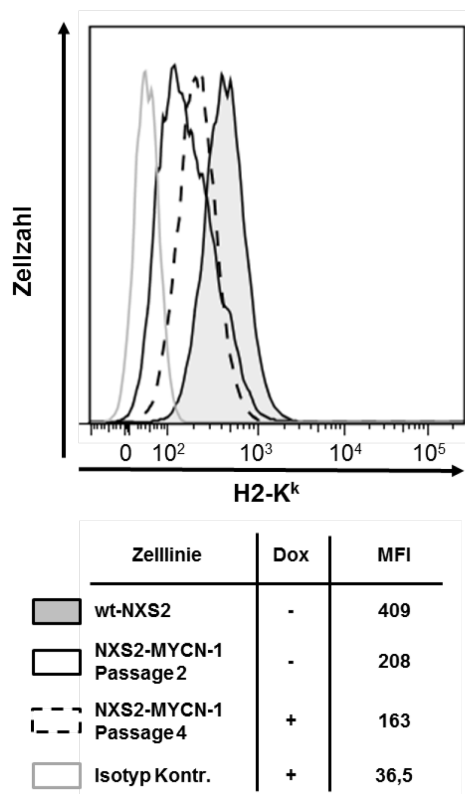
- A) In dieser Abbildung sind ein metastasiertes Ovar in einer Maus und daneben das heraus präparierte Ovar dargestellt.
- B) Dieses Bild zeigt zum Vergleich eine unbehandelte gesunde Maus als Kontrolle.
- C) Diese Abbildung repräsentiert eine von Metastasen befallene Leber aus einer A/J-Maus, der wt-NXS2-Zellen injiziert wurden (Bild wurde freundlicher Weise von PD Dr. Stefan Fest bereitgestellt).

Da die NXS2-MYCN-1-Zellen ein vergleichbares Metastasierungsmuster aufwiesen wie die C1300-MYCN-A-Zellen, wurde im weiteren Verlauf das gleiche neu etablierte *Staging System* zur Auswertung der Metastasierung verwendet (siehe Tab. 4.5.1).

#### 4.5.4 Expression von H2-K<sup>k</sup> auf NXS2-MYCN-1-nach *in-vivo*-Passagierung

Nachdem die Anwachsrate der NXS2-MYCN-1-Tumoren verbessert und eine erhöhte MYCN-Expression in den passagierten Zellen nachgewiesen wurde, wurde erneut die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle H2-K<sup>k</sup> untersucht, um eine ausreichende H2-K<sup>k</sup>-Präsentation auf den passagierten Zellen zu verifizieren.

Zu diesem Zweck wurde eine H2-K<sup>k</sup>-FACS-Färbung mit den NXS2-MYCN-1-Zellen der einzelnen Passagen durchgeführt (Abb. 4.5.8).



**Abb. 4.5.8: Bestimmung der MHC-Klasse-I-Expression passagierter NXS2-MYCN-1-Zellen.**

NXS2-MYCN-1-Zellen jeder *in-vivo*-Passage und wt-NXS2-Zellen wurden mit einem FITC-markierten-H2-K<sup>k</sup>-Antikörper gefärbt. Anschließend wurde die Expression von H2-K<sup>k</sup>-Molekülen auf der Zelloberfläche mit Hilfe von Durchflusszytometrie bestimmt. Die Präsentationsdichte der MHC-Moleküle wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle bestimmt.

Die FACS-Messung zeigte, dass die Menge der exprimierten MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche mit zunehmender Mauspassage abnahm und die Tumorzellen der vierten Passage im Vergleich zur wt-Zelllinie um mehr als die Hälfte reduziert war (MFI 409 zu 163). Bei Betrachtung der MycN-Expressionen der jeweiligen Passage im Western-Blot (Abb.4.5.6) und diesen FACS-Daten ist eine inverse Korrelation zwischen der MycN-Proteinmenge und H2-K<sup>k</sup>-Präsentation festzustellen.

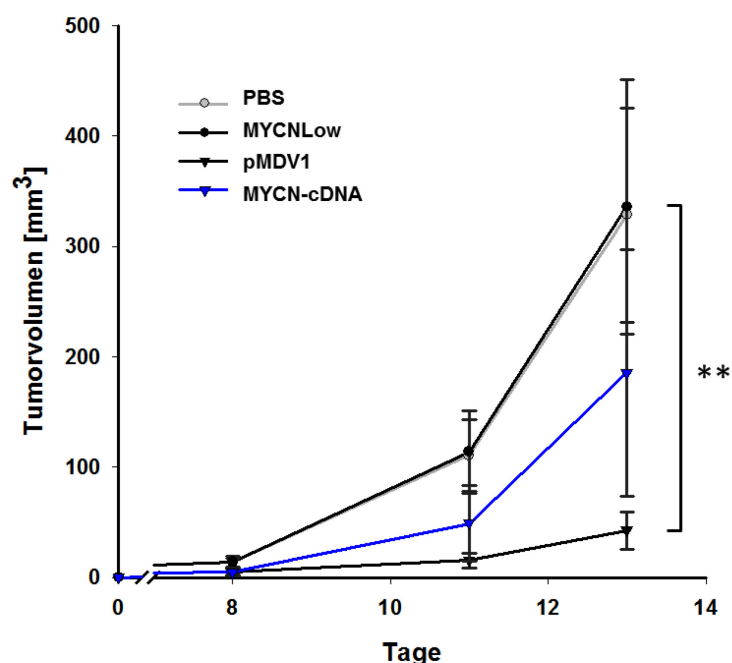
Unabhängig von dieser Beobachtung sollte die Anzahl präsentierter H2-K<sup>k</sup>-Moleküle auf den Zellen der vierten Passage ausreichen, um eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Denn um eine zytotoxische T-Zell-Antwort zu erzeugen, genügt bereits eine geringe Anzahl präsentierter MHC-Klasse-I-Moleküle (Spierings *et al.*, 2000). Somit wurden die NXS2-MYCN-1-Zellen der vierten Passage für die folgenden Vakzinierungsversuche verwendet.

#### 4.6 Analyse der Wirksamkeit von MYCN-DNA-Vakzinen *in vivo*

Mit den in den Abschnitten 4.4 und 4.5 beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde die Etablierung der beiden Zelllinien NXS2-MYCN-1 und C1300-MYCN-A abgeschlossen. Im Folgenden wurden diese beiden MYCN-Mausmodelle für die Untersuchung der Wirkungsmechanismen der MYCN-spezifischen DNA-Vakzinierungen eingesetzt.

#### 4.6.1 MYCN-DNA-Vakzinierung reduziert das Primärtumorwachstum subkutan injizierter NXS2-MYCN-1-Zellen

Im zweiten *in-vivo*-Versuch wurde die Wirkung einer prophylaktischen Immunisierung (Abb.4.2.1) mit den MYCN-DNA-Vakzinen auf das Primärtumorwachstum der neuen NXS2-MYCN-1-Tumoren untersucht. Es wurden vier Gruppen à neun Mäusen verwendet. Eine Gruppe wurde mit dem DNA-Impfstoff pMDV1, eine zweite mit dem DNA-Vakzin MYCN-cDNA und die dritte mit MYCNLow geimpft. Die Kontrollgruppe bekam PBS verabreicht (=PBS-Kontrolle). Dieser Versuch wurde analog zum *in-vivo*-Experiment mit den wt-NXS2-Zellen durchgeführt (Abschnitt 4.2). Im Unterschied zum ersten Vakzinierungsversuch wurden aber die Primärtumoren nicht alle am gleichen Tag entfernt, sondern einzeln und erst wenn sie ein Volumen von mehr als ca. 500 mm<sup>3</sup> erreicht hatten. Somit konnte neben dem Tumorwachstum bis zur ersten Maus-OP (Abb. 4.6.1) bestimmt werden, wie effektiv das Tumorwachstum durch die eingesetzten Vakzine verzögert werden kann (Abb. 4.6.2B).



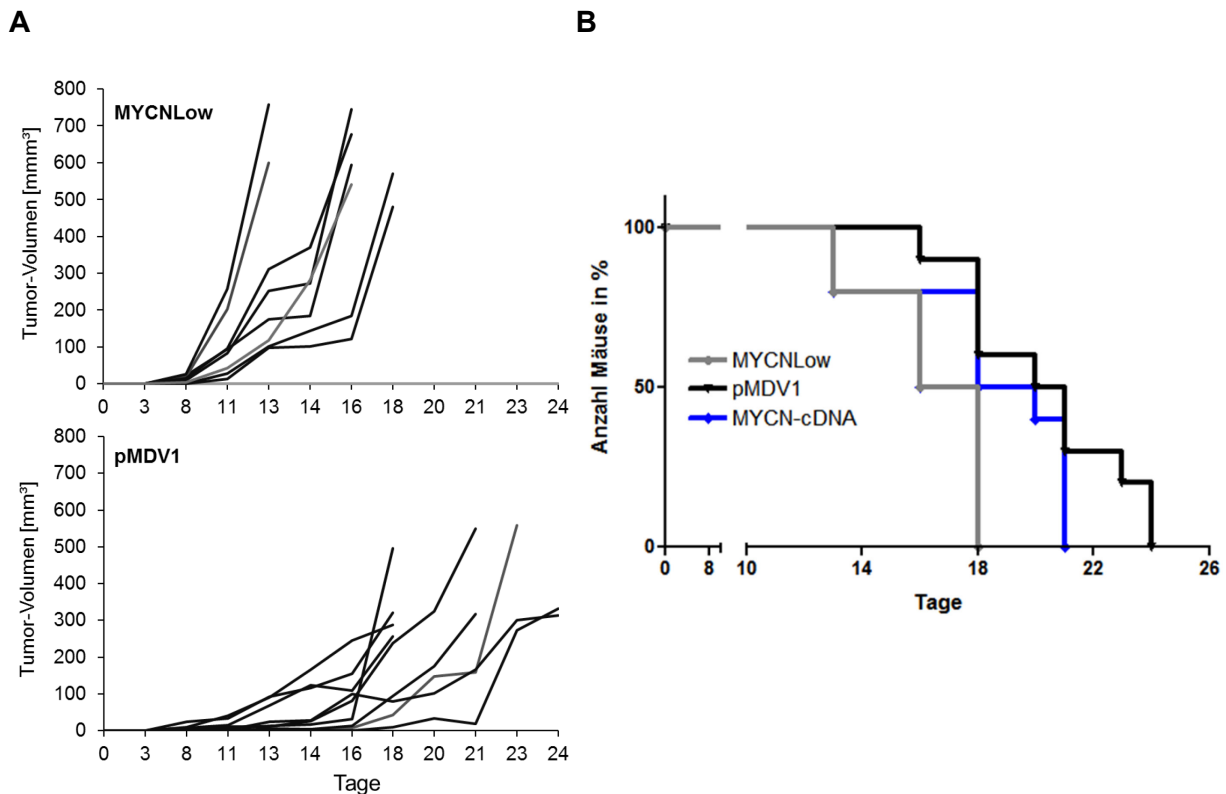
**Abb. 4.6.1: Primärtumorwachstum nach prophylaktischer MYCN-DNA-Vakzinierung.**

Jeweils neun Mäuse pro Gruppe wurden dreimal über einem Zeitraum von 21 Tagen mit den DNA-Vakzinen MYCNLow, pMDV1 oder MYCN-cDNA geimpft. Drei Tage nach der letzten Impfung wurden den Tieren  $4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-1-Zellen subkutan injiziert. Anschließend wurde das Primärtumorwachstum bis Tag 13 gemessen (Tag der ersten Maus-OP). Gezeigt werden das mittlere primäre Tumorwachstum über 13 Tage und der zugehörige Standardfehler als Fehlerbalken. Durch die Impfung mit pMDV1 und MYCN-cDNA wurde das Tumorwachstum reduziert. Dabei war der Unterschied zwischen PBS- bzw. MYCNLow und pMDV1 immunisierter Mäuse statistisch sehr signifikant ( $p=0,0019$ ). (\*\* =  $p < 0.01$ , Mann-Whitney-U-Test) ( $n=9$ ).

Die Ergebnisse dieses *in-vivo*-Versuchs zeigten, dass sowohl durch das *full-length* MYCN-cDNA- als auch durch das pMDV1-Vakzin, mit den vorhergesagten starken MHC-Klasse-I-

Liganden, eine Reduktion des NXS2-MYCN-1-Primärtumorwachstums im Vergleich zu den Kontrollgruppen PBS und MYCNLow erreicht wurde. Dabei war das Tumorwachstum der pMDV1-Gruppe im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen PBS und MYCNLow sehr signifikant reduziert.

Im weiteren Verlauf des Experiments wurde festgehalten, nach wie vielen Tagen nach der Injektion die einzelnen Primärtumoren eine Größe von mehr als 500 mm<sup>3</sup> erreicht hatten und/oder aufgrund von Nekrose chirurgisch entfernt werden mussten (Abb. 4.6.2).



**Abb. 4.6.2: Tumorwachstum einzelner Primärtumoren und Kaplan-Mayer-Kurve der Tage bis zur OP.**

Jeweils neun DNA-Vakzinen geimpften Mäusen pro Gruppe wurden 4x10<sup>6</sup> NXS2-MYCN-1-Zellen subkutan injiziert und anschließend das Primärtumorwachstum in den einzelnen Tieren bis zur Operation bestimmt (mindestens 500 mm<sup>3</sup>).

- A)** In dieser Abbildung ist das Wachstum einzelner Tumoren in pMDV1- und MYCNLow-behandelten Mäusen bis zur chirurgischen Intervention aufgeführt. In der pMDV1-geimpften Gruppe mussten, wie an den Graphen zu erkennen, einige Tumoren aufgrund von Nekrose entfernt werden, bevor sie eine Größe von 500 mm<sup>3</sup> erreichten. Zudem fehlt in der MYCNLow-behandelten Gruppe eine Maus; diese verstarb nach der dritten Impfung.
- B)** In Abbildung B ist eine Kaplan-Maier-Kurve der pMDV1-, MYCN-cDNA- und MYCNLow-geimpften Tiere bis zum Tag ihrer OP aufgeführt. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p=0,326$  pMDV1 im Vergleich zu MYCNLow). (\* =  $p<0.05$ , Mann-Whitney-U-Test). (n=9).

Anhand des Wachstums der einzelnen Primärtumoren (**A**) und den Tagen bis zur chirurgischen Intervention (**B**) wurde deutlich, dass eine Immunisierung mit pMDV1 und MYCN-cDNA das Tumorwachstum reduzierte und Tiere später operiert werden mussten als



Mäuse der Kontrollgruppen. Während des Versuchs mussten zudem einige Primärtumoren der pMDV1-geimpften Tiere aufgrund von Nekrose bereits bei kleineren Volumen als 500 mm<sup>3</sup> entfernt werden.

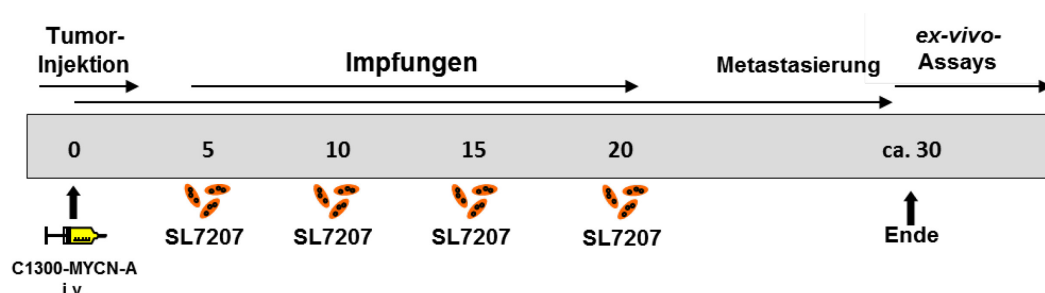
Das Tumorwachstum in Tieren der PBS-behandelten Gruppe war vergleichbar mit dem der MYCN<sup>Low</sup>-geimpften Mäuse. Die mit MYCN-cDNA-behandelten Tiere wiesen ein sehr heterogenes Tumorwachstum auf; zwei Mäuse hatten nekrotische Tumoren, die bei einem relativ kleinen Volumen entfernt werden mussten und andere wuchsen hingegen wie die Tumoren PBS-behandelter Tiere.

Die während des Versuchs entfernten Tumoren wurden für immunhistologische Untersuchungen bis zur weiteren Verwendung in Formalin gelagert.

Nach den chirurgischen Interventionen wurde der Zeitraum bis zur Entwicklung von Metastasen bestimmt. Sobald Mäuse erkennbar erkrankten, wurden sie getötet und sezziert. Für den Zeitraum zwischen Eingriff und Tötung konnten keine Unterschiede zwischen den Mausgruppen beobachtet werden. Alle Mäuse, unabhängig von ihrer Behandlung, erkrankten innerhalb von 26 bis 32 Tagen nach Entfernung ihrer Primärtumore (Daten nicht gezeigt). Auch bei diesem Versuch bildeten die MYCN-NXS2-1-Zellen weitestgehend Metastasen in den Ovarien und Lymphknoten.

#### 4.6.2 MYCN-DNA-Vakzinierung verzögert die Metastasenbildung durch i.v. injizierte C1300-MYCN-A-Zellen

In einem weiteren *in-vivo*-Versuch wurden die Wirkungen der MYCN-DNA-Vakzine in einem therapeutischen Versuchsablauf mit der C1300-MYCN-A-Zelllinie untersucht (Abb.4.6.3).

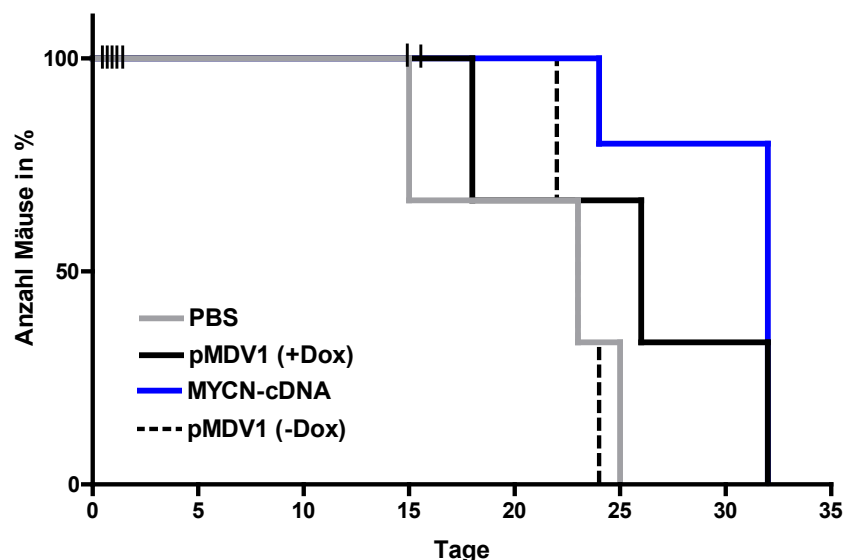


**Abb. 4.6.3: Therapeutischer *in-vivo*-Versuchsablauf.**

Mäusen wurden am Tag 0  $3 \times 10^6$  C1300-MYCN-A-Zellen in 200 µl Medium i.v. injiziert. Fünf Tage nach Tumorenjektion wurden die Tiere viermal im Abstand von fünf Tagen mit je  $5 \times 10^8$  Vakzin-tragenden Salmonellen geimpft (Tage 5, 10, 15 und 20). Ungefähr nach 30 Tagen, je nach Erkrankung, wurden die Tiere getötet und der Grad der Metastasierung festgestellt. Die Auswertung zur Wirksamkeit der Vakzine wurde anhand der Überlebensrate bis zum Tod der Tiere bestimmt. Anschließend wurden mit isolierten Splenozyten aus den geimpften Tieren *ex-vivo*-Assays zur Charakterisierung der Immunantwort durchgeführt.



Für dieses Experiment wurden  $5 \times 10^8$  Salmonellen appliziert und die Impfungen 4mal im Abstand von fünf Tagen über einen Zeitraum von 20 Tagen wiederholt. Während des gesamten Versuchs wurden die Tiere im Abstand von zwei Tagen untersucht und bei äußerlich erkennbarer Erkrankung getötet. Der gesamte Versuch wurde am Tag 32 beendet, da alle Tiere der Gruppen PBS und pMDV1 gestorben waren, einzig vier Tiere der MYCN-cDNA-Gruppe überlebten ereignisfrei bis zu diesem Zeitpunkt (Abb. 4.6.4).



**Abb. 4.6.4: Überlebensrate geimpfter Mäuse.**

24 Mäusen wurden  $3 \times 10^6$  C1300-MYCN-A-Zellen i.v. injiziert und in vier Gruppen aufgeteilt. Anschließend erfolgten vier gruppenspezifische Impfungen im Abstand von fünf Tagen über einen Zeitraum von 20 Tagen. Im Folgenden wurden die Tiere beobachtet, äußerlich erkennbar erkrankte Tiere wurden getötet und hinsichtlich ihrer Metastasierung untersucht. In der Kaplan-Meier-Kurve ist die Anzahl überlebender Tiere in Prozent bis zum Ende des Versuchs aufgeführt. In den Gruppen pMDV1 (+Dox), (-Dox) und MYCN-cDNA starben insgesamt fünf Tiere nach Tumorinjektion oder Impfung (markiert durch schwarze Querstriche). Am Tag 32 wurde der Versuch beendet, da die letzte Maus der pMDV1 (+Dox) behandelten Gruppe verstarb. Obwohl eine deutliche Verlängerung der Überlebensrate zu erkennen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede bestimmt werden ( $p=0,526$  MYCN-cDNA zu PBS).

(\* =  $p < 0.05$ , Mann-Whitney-U-Test). (n=6).

Mit diesem Vakzinierungsexperiment wurde die Wirksamkeit der MYCN-DNA-Vakzine in einem therapeutischen Versuchsablauf analysiert. Zur Auswertung wurde die ereignisfreie Überlebensrate bis zum Tode der Tiere verwendet. Wie der Kaplan-Mayer-Kurve zu entnehmen, starben jeweils zwei Tiere der pMDV1 (-Dox und +Dox)- und ein Tier der MYCN-cDNA-behandelten Gruppe direkt nach der Tumorinjektion. Zwei weitere Mäuse der pMDV1 (-Dox und +Dox)-Gruppen verstarben nach oraler Impfung am Tag 15 und 16. Bei der Sezierung dieser Tiere wurde keine Metastasierungen festgestellt.

Unter Berücksichtigung dieser Ausfälle war in der Kaplan-Mayer-Kurve dennoch eine deutliche Verlängerung der Überlebensrate von pMDV1- und besonders MYCN-cDNA-geimpften Tieren zu erkennen. In beiden Kontrollgruppen (PBS und pMDV1 (-Dox)) mussten

bis Tag 25 alle Mäuse aufgrund von Metastasen getötet werden. Im Gegensatz dazu wurden die verbliebene Maus der pMDV1-Gruppe (+Dox) und die letzten vier Tiere der MYCN-cDNA-behandelten Gruppe nur aufgrund des Versuchsendes am Tag 32 getötet. Bei einer anschließenden Sezierung wurde festgestellt, dass diese Tiere noch keine Metastasen gebildet hatten und gesund waren.

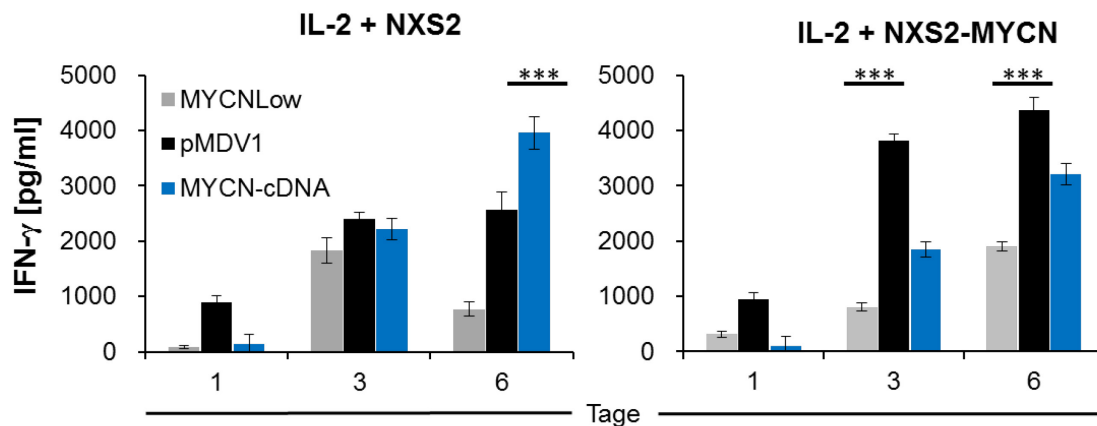
Unter Berücksichtigung der Metastasenbildung nach 21 Tagen von C1300-MYCN-A-Zellen in unbehandelten, mit Doxycyclin genährten Tieren (siehe Abb. 4.5.1), war das um 10 Tage verlängerte tumorfreie Leben der pMDV1 und MYCN-cDNA-behandelten Mäuse ein deutlicher Nachweis der *MYCN*-spezifischen Anti-Tumorstimmung der DNA-Vakzine.

#### **4.7 Charakterisierung der Immunantworten *ex vivo***

Für die Charakterisierung der Immunantwort wurden während bzw. nach jedem *in-vivo*-Versuch Splenozyten aus den Milzen der behandelten Tiere isoliert und für Zytotoxizitätsassays oder IFN- $\gamma$ -ELISAs zur Untersuchung der *MYCN*-Spezifität verwendet. Da alle Tiere unabhängig von den applizierten Zellen die gleichen Impfungen erhielten (Abschnitt 4.6.1 und 4.6.2) und die Ergebnisse der *ex-vivo*-Assays beider *in-vivo*-Versuche übereinstimmende Ergebnisse lieferten, wurden sie im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

##### **4.7.1 Antigen-abhängige IFN- $\gamma$ -Sekretion von Splenozyten geimpfter Mäuse**

Wie bereits beschrieben, kann anhand des proinflammatorischen Zytokins Interferon- $\gamma$  die Aktivität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Splenozyten von Tieren der *in-vivo*-Versuche aus Abschnitt 4.6 isoliert und IFN- $\gamma$ -ELISAs durchgeführt. Für die Stimulierung der Splenozyten wurden neben IL-2 inaktivierte NXS2-MYCN-1-Zellen verwendet. Dabei sollten die NXS2-MYCN-1-Zellen aufgrund der auf der Zellmembran exprimierten *MYCN*-Antigene spezifisch von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten der geimpften Mäuse erkannt werden und diese dadurch zur Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$  anregen. Während der Co-Inkubation wurden täglich Mediumüberstände gesammelt und schließlich die Konzentrationen des freigesetzten IFN- $\gamma$  der Tage 1, 3 und 6 bestimmt (Abb. 4.7.1).



**Abb. 4.7.1: Antigen-abhängige IFN- $\gamma$ -Sekretion isolierter Lymphozyten aus geimpften Mäusen.**

Aus pMDV1, MYCN-cDNA-Vakzin und MYCNLow-geimpften Mäusen wurden Lymphozyten isoliert und für sechs Tage mit 100 IU/ml IL-2 und inaktivierten Zellen bei 37 °C stimuliert (bestrahlt mit 50 Gy). Jeweils ein Teil der Lymphozyten wurde mit inaktivierten wt-NXS2- und der andere Teil mit inaktivierten NXS2-MYCN-1-Zellen stimuliert. Das Verhältnis zwischen Lymphozyten und Zellen betrug 100:1. Täglich wurden 250  $\mu$ l Überstand abgenommen. Der Nachweis von IFN- $\gamma$  erfolgte mit einem ELISA. Dargestellt sind die IFN- $\gamma$  Konzentrationen der Tage 1, 3 und 6. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

(\* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; *unpaired-Student's T-Test*). (n=3).

Die Ergebnisse des ELISA zeigten, dass die IFN- $\gamma$ -Sekretion der Lymphozyten aus pMDV1- und MYCN-cDNA-geimpften Tieren unabhängig der Stimulierung insgesamt höher war als die aus den MYCNLow-behandelten Mäusen.

Bei Inkubation der Splenozyten mit IL-2 und wt-NXS2 nahm der IFN- $\gamma$ -Release von Tag eins bis Tag sechs in allen Gruppen stetig zu, wobei die gemessene Konzentration bei pMDV1- und MYCN-cDNA stets höher war als bei MYCNLow. Am Tag sechs war der Unterschied zwischen pMDV1 und MYCNLow hoch signifikant.

Wurden die Immunzellen hingegen mit IL-2 und NXS2-MYCN-1 co-inkubiert stieg die IFN- $\gamma$ -Produktion der Gruppen pMDV1 und MYCN-cDNA deutlich, wohingegen bei den Splenozyten der MYCNLow-Gruppe nur geringe Mengen an IFN- $\gamma$  gemessen wurde. Die Unterschiede zwischen pMDV1 und MYCNLow S waren dabei nach drei und sechs Tagen hoch signifikant. Die höchste IFN- $\gamma$ -Freisetzung zeigten nach sechs Tagen, mit ca. 4500 pg/ml, die Splenozyten der pMDV1 behandelten Mäuse.

Interessanterweise war die IFN- $\gamma$ -Produktion der MYCN-cDNA-Lymphozyten am Tag sechs nach wt-NXS2 und IL-2 Stimulierung etwas höher als bei Co-Inkubation mit IL-2 und NXS2-MYCN-1.

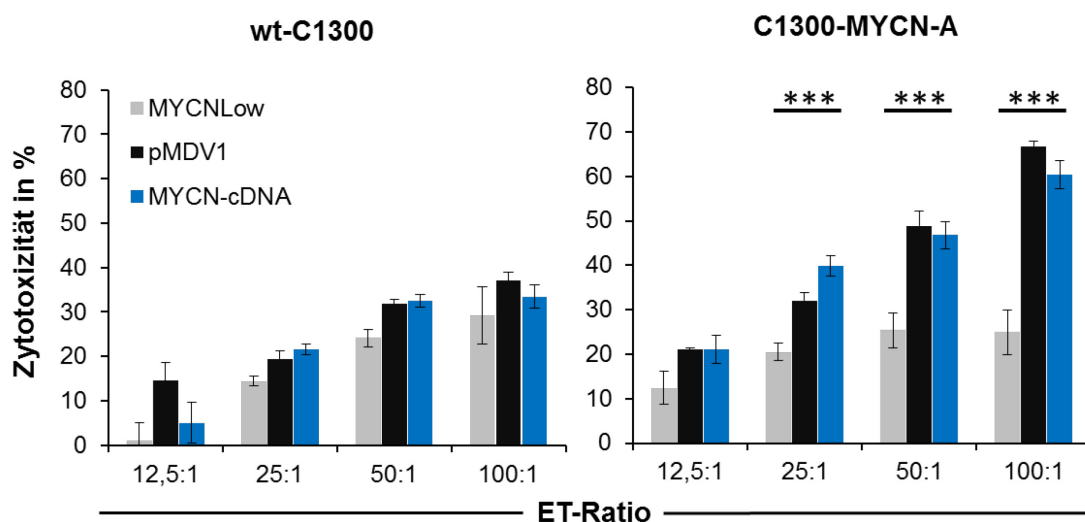
Die Ergebnisse zeigten somit, dass Lymphozyten aus pMDV1 und MYCN-cDNA geimpften Tieren spezifisch durch die MYCN-Epitope auf dem Transfektant stimuliert und zur IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt werden. Bei Splenozyten aus der Kontrollgruppe MYCNLow wurde hingegen keine spezifische Reaktion beobachtet.

#### 4.7.2 Spezifische durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Lyse von C1300-MYCN-A

Wie gezeigt wurde führte die Impfung von Mäusen mit pMDV1 und MYCN-cDNA, im Vergleich zu den Kontrollen, zu einer deutlichen Verzögerung der Metastasierung (C1300-MYCN-A) und Reduktion des primären Tumorstwachstums (NXS2-MYCN-1) (Abb. 4.6.1 und Abb. 4.6.4).

Mit Hilfe von Zytotoxizitätsassays sollte nun im Anschluss der *in-vivo*-Versuche untersucht werden, ob eine MYCN-spezifische Immunantwort, vermittelt durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen, für das reduzierte Tumorstwachstum verantwortlich war.

Zu diesem Zweck wurden Splenozyten aus den geimpften Mäusen isoliert und mit IL-2 reaktiviert. Anschließend wurden sie als Effektorzellen auf die Zielzellen wt-C1300 oder C1300-MYCN-A (+Dox) gegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde dann die Zytotoxizität der Lymphozyten mit einem LDH-Assay bestimmt (Abb. 4.7.2).



**Abb. 4.7.2: Ex-vivo-Zytotoxizität von Splenozyten geimpfter Mäuse.**

Splenozyten wurden aus den Milzen geimpfter Mäuse isoliert (Abschnitt 4.6) und gruppenspezifisch gepoolt. Anschließend wurden sie zur Reaktivierung fünf Tage mit 100 IE/IL-2 reaktiviert und dann als Effektorzellen in den im Diagramm angegebenen ET-Verhältnissen auf wt-C1300- (links) oder C1300-MYCN-A-Zellen gegeben (rechts). Nach vierstündiger Inkubation wurde die Zytotoxizität mit Hilfe eines LDH-Assays bestimmt.

Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

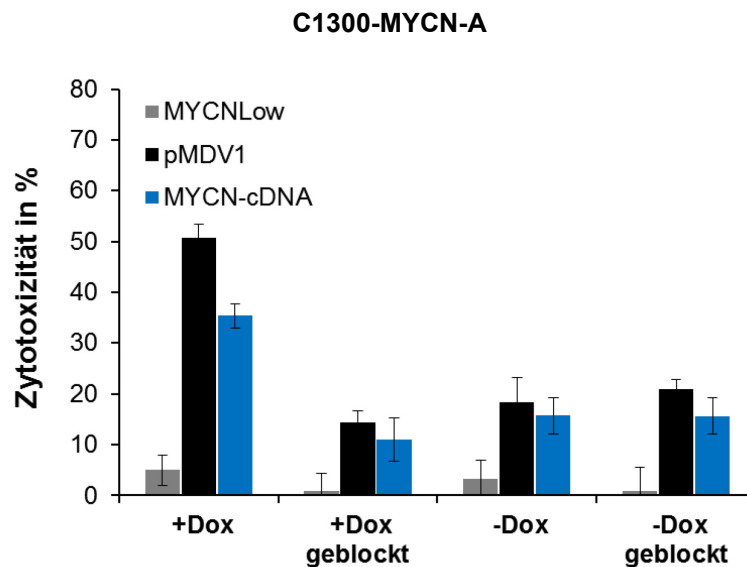
(\* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; *unpaired-Student's T-Test*). (n=3).

In der Abbildung 4.7.2 wurde die prozentuale Zytotoxizität der Splenozyten der MYCN<sup>Low</sup>-, MYCN-cDNA- und der pMDV1-geimpften Tiere gegenüber wt-C1300 und dem C1300-Transfektanten aufgeführt. Die Splenozyten der pMDV1- und MYCN-cDNA-behandelten Gruppen zeigten, unabhängig von den verwendeten ET-Verhältnissen, eine um ca. 10% erhöhte Zytotoxizität gegenüber wt-C1300-Zellen im Vergleich zu den Splenozyten der Kontrollgruppe (**links**), wobei nur geringe Unterschiede zwischen dem *full-length* MYCN-

cDNA und dem Minigen-Vakzin pMDV1 zu beobachten waren. Insgesamt wurde gegenüber wt-C1300-Zellen eine maximale Zytotoxizität von 30% bei einer ET-Ratio von 100:1 gemessen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren eher gering und nicht signifikant.

Wurden hingegen C1300-MYCN-A als Zielzellen verwendet, vergrößerten sich die vermittelten Zytotoxizitäten zwischen den untersuchten Gruppen deutlich (**rechts**). Schon bei einem ET-Verhältnis von 25:1 lag die gemessene Zytotoxizität der Splenozyten MYCN-cDNA-behandelter Tiere bei ca. 30% und die von den pMDV1-behandelten bei ca. 25%. Mit zunehmendem ET-Verhältnis stiegen diese Werte auf über 60% (bei ET-100:1). Im Vergleich dazu wiesen die Lymphozyten der MYCN<sub>Low</sub>-geimpften Tiere eine maximale Zytotoxizität von 25% bei einer ET-Ratio von 100:1 auf. Die Unterschiede zwischen MYCN<sub>Low</sub> und pMDV1 waren dabei ab einem ET-Verhältnis von 25:1 hoch signifikant (bei 100:1  $p=0,00024$ ) und bewiesen eine deutliche MYCN-Spezifität der Splenozyten pMDV1-behandelter Tiere.

Mit Hilfe eines weiteren Zytotoxizitätsassay wurde im weiteren Verlauf untersucht inwieweit die Immunantwort durch spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wurde und welcher Anteil unspezifisch war. Zu diesem Zweck wurde vor der Durchführung des Assays das MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> auf den Zielzellen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers blockiert. Durch die Blockierung des MHC-Moleküls wurde eine spezifische Lyse der Zielzellen durch zytotoxischen T-Lymphozyten unterbunden und ausschließlich eine unspezifisch vermittelte Immunreaktion ermöglicht. So konnte anhand der Unterschiede zwischen geblockten und unbehandelten Zellen der Anteil der durch MYCN-spezifische zytotoxische T-Zellen vermittelten Lyse bestimmt werden (Abb.4.7.3).



**Abb. 4.7.3: Zytotoxizität von Splenozyten geimpfter Mäuse nach Blockierung des MHC-Klasse-I-Moleküls H2-K<sup>k</sup>.**

Splenozyten wurden aus den Milzen geimpfter Mäuse isoliert und Gruppen-spezifisch gepoolt (pMDV1, MYCN-cDNA und MYCN<sup>Low</sup>). Nach einer fünftägigen Reaktivierung mit 100 IE/IL-2 wurden die Splenozyten als Effektorzellen in einem ET-Verhältnis von 50:1 auf unterschiedlich behandelte C1300-MYCN-A-Zellen gegeben. Nach vier Stunden Inkubation wurde die Zytotoxizität mit einem LDH-Assay bestimmt. Folgende C1300-MYCN-A-Zellen wurden als Zielzellen eingesetzt (von links nach rechts):

1. 6h mit Doxycyclin inkubiert.
  2. Wie 1, aber für 1h mit 1 µg/ml H2-K<sup>k</sup> Antikörper geblockt.
  3. C1300-MYCN-A ohne Doxycyclin.
  4. Wie 3, aber für 1h mit 1 µg/ml H2-K<sup>k</sup> Antikörper geblockt.
- Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. (n=4).

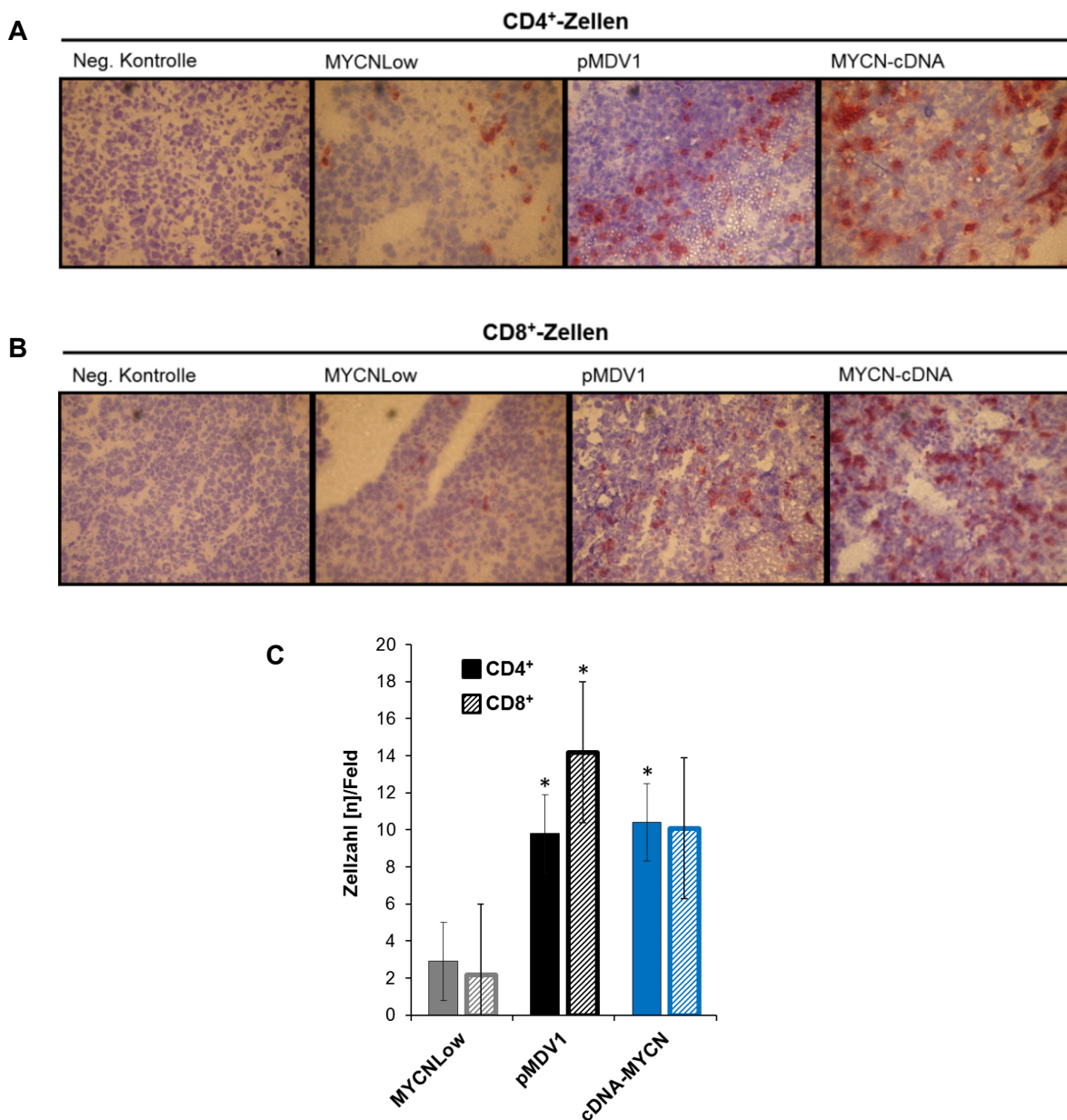
Die Blockierung des MHC-Moleküls H2-K<sup>k</sup> führte, wie der Abbildung 4.7.3 zu entnehmen, zu einer deutlichen Reduzierung der vermittelten Zytotoxizität von Splenozyten aus pMDV1- und MYCN-cDNA-geimpften Mäusen um ca. zweidrittel (50% auf 15%) gegenüber MYCN-exprimierenden Zellen (+Dox).

Interessanterweise wurden die Zielzellen bei abgeschaltetem MYCN-Gen (-Dox), unabhängig ob blockiert oder nicht, ähnlich stark lysiert wie die geblockten Zellen mit MYCN-Expression.

Die Ergebnisse dieses Zytotoxizitätsassays zeigten deutlich, dass ein Großteil der Immunantwort die zur Reduzierung der Primärtumoren beitrug, durch MYCN-spezifische CTLs vermittelt wurde. Der verbliebene Anteil von ca. 15% nach Blockierung von H2-K<sup>k</sup> wurde demnach durch unspezifische Immunzellen, wie zum Beispiel NK-Zellen oder Makrophagen vermittelt.

### 4.7.3 Tumorinfiltration durch CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Vakzinierung

Aus den in Einbettmedium fixierten Primärtumoren der unterschiedlich behandelten Mäuse aus Abschnitt 4.6.1 wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese auf tumorinfiltrierende CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten untersucht. In Abbildung 4.7.4A sind repräsentative Bilder dieser Tumoren gezeigt. Für eine quantitative Auswertung wurden von jeweils vier Tumorschnitten einer Mausgruppe die infiltrierenden Immunzellen mit einer 400fachen Vergrößerung in zehn Sichtfeldern ausgezählt und bestimmt (Abb. 4.7.4C).



**Abb. 4.7.4: Tumor-infiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Primärtumoren geimpfter Mäuse.**

A/J-Mäuse wurden dreimal mit den DNA-Impfstoffen pMDV1, MYCNLow und MYCN-cDNA geimpft und anschließend  $4 \times 10^6$  NXS2-MYCN-A-Tumorzellen subkutan injiziert (siehe Abb. 4.2.1). Nach ca. 14 Tagen wurden die entstandenen Primärtumoren entfernt und in Einbettmedium eingefroren. Anschließend wurden Gefrierschnitte angefertigt und hinsichtlich Tumor-infiltrierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit Hilfe einer HE-Färbung untersucht. Die Bilder sind exemplarisch für weitere gefärbte Schnitte.

Für die quantitative Auswertung wurde die Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten in vier Tumoren pro Mausgruppe, durch Auszählen von acht Sichtfeldern bei einer 400fachen Vergrößerung, bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte samt ihrer Standardabweichungen.

(\* =  $p < 0.05$ , *unpaired-Student's-t-Test*). (n=8).

- A) Abgebildet sind Tumorschnitte, die mit CD4-spezifischen Ak markiert wurden.
- B) Abgebildet sind Tumorschnitte, die mit CD8-spezifischen Ak markiert wurden.
- C) Mittelwerte aus der Anzahl gezählter Tumor-infiltrierender Lymphozyten je Sichtfeld.

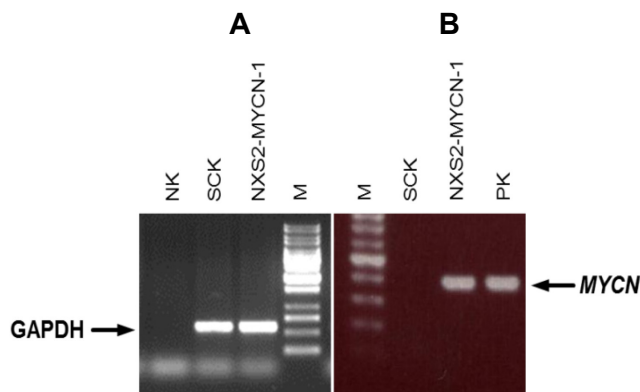
Wie der Abbildung zu entnehmen, führten die Impfungen mit dem Minigen-Vakzin pMDV1 und der MYCN-cDNA zu einer erhöhten Anzahl an Tumor-infiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Im Vergleich zu den beiden genannten Gruppen wurden in den Tumoren der MYCN<sub>Low</sub>-behandelten Tiere nur wenige Lymphozyten gefunden. Anhand der Auszählung wurde deutlich, dass die Tumoren geimpfter Tiere nicht nur durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert wurden, sondern in nahezu gleicher Menge von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die Anzahl der ausgezählten Lymphozyten in den pMDV1- und MYCN-cDNA-Gruppen war insgesamt signifikant höher als bei den Tumoren der MYCN<sub>Low</sub>-behandelten Gruppe.

#### 4.7.4 Nachweis einer MYCN-spezifischen Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten MYCN-DNA-vakzinierter Mäuse

Zum Beweis, dass die durch pMDV1 induzierte Immunantwort spezifisch gegen die ausgewählten MYCN-Epitope der Minigene und somit MYCN gerichtet war, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit Lymphozyten der pMDV1- und MYCN<sub>Low</sub>- Gruppe als Effektorzellen und SCK als Zielzelle durchgeführt. SCK ist eine Mamma-Karzinom-Zelllinie, die, wie NXS2, syngen zu A/J-Mäusen ist und das MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> auf Ihrer Oberfläche exprimiert (Huebener *et al.*, 2008). Im Unterschied zu wt-NXS2 exprimieren SCK-Zellen kein MYCN und sollten deshalb nicht durch MYCN-spezifische Lymphozyten lysiert werden. Zum Nachweis für eine MYCN-Epitop-spezifische Lyse wurden SCK-Zellen als Zielzellen verwendet, die mit den drei für pMDV1 kodierenden MYCN-Epitop-Peptiden gepulst wurden. Als Negativ-Kontrolle wurden unbehandelte SCK-Zellen eingesetzt.

Bevor der eigentliche Assay durchgeführt werden konnte, musste zunächst überprüft werden, ob die SCK-Zellen keine eigene MYCN-Expression aufweisen. Dies wurde auf RNA-Ebene untersucht und mittels RT-PCR mit MYCN-spezifischen Primern durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde cDNA von NXS2-MYCN-1 und das Plasmid pCDNA4/TO-MYCN verwendet (Abb. 4.7.5).

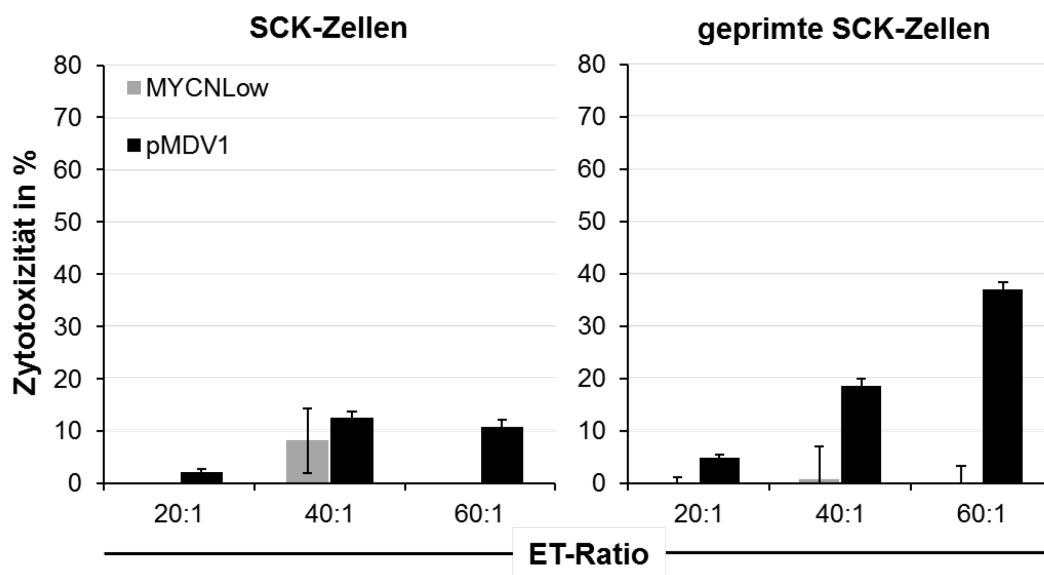




**Abb. 4.7.5: Nachweis der *MYCN*-Defizienz in SCK-Zellen.**

Aus SCK-Zellen und der Positiv-Kontrolle NXS2-MYCN-1-Zellen wurde mRNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR zum Nachweis von GAPDH als Kontrolle (**A**) sowie *MYCN* (**B**) als durchgeführt. Gezeigt ist die GAPDH- und *MYCN*-Expression in SCK- und NXS2-MYCN-1-Zellen. **NK**= H<sub>2</sub>O als Template, bei A) **M**= 100bp Marker, bei B) **M**= 1kb Marker.

Anhand der PCR wurde gezeigt, dass SCK-Zellen keine eigene *MYCN*-Expression aufweist. Um schließlich die *MYCN*-Epitop-Spezifität zu untersuchen, wurde ein Teil der SCK-Zellen mit den drei ausgewählten *MYCN*-Epitopen, für die pMDV1 kodiert, in Form von Peptiden, gepulst (Kubitscheck *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1999) (Abschnitt 3.8.4). Dann wurden die Zellen neben unbehandelte SCK-Zellen als Zielzellen in einem LDH-Assay eingesetzt. Als Effektorzellen wurden, wie oben beschrieben, die isolierten Lymphozyten aus pMDV1- und MYCN<sub>Low</sub>-geimpften Mäusen verwendet (Abb. 4.7.6).



**Abb. 4.7.6: Nachweis der spezifischen Lyse *MYCN*-Epitop gepulster SCK-Zellen.**

Dargestellt ist die prozentuale Lyse-Rate von Splenozyten aus einer Kontroll- (MYCN<sub>Low</sub>) und einer pMDV1-geimpften Gruppe gegenüber unbehandelten (links) und mit *MYCN*-Epitopen gepulsten (rechts) SCK-Zellen. Untersucht wurden ET-Verhältnisse von 20 bis 60 zu 1. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (n=3).

Bei diesem Assay zeigten die Lymphozyten beider Mausgruppen (MYCN<sub>Low</sub> und pMDV1) nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber unbehandelten SCK-Zellen. Wurden hingegen mit den MycN-Epitopen gepulste SCK-Zellen als Zielzelllinie eingesetzt, wurden diese

ausschließlich von Lymphozyten der pMDV1-geimpften Mäuse lysiert. Bei einem ET-Verhältnis von 60:1 wurde eine Zytotoxizität von ca. 40% gemessen.

Mit den Ergebnissen wurde bewiesen, dass durch die Immunisierung mit pMDV1 in A/J-Mäusen eine Immunantwort induziert wurde, die spezifisch für die im Minigen kodierten MycN-Epitope war.

## 5. Diskussion

### 5.1 Immuntherapien beim Neuroblastom

#### 5.1.1 *MYCN* als Ziel einer aktiven Immuntherapie des Neuroblastoms

Neuroblastome mit *MYCN*-Amplifikation stellen nach wie vor eine große Herausforderung für die pädiatrische Onkologie dar. Obwohl die allgemeine ereignisfreie 3-Jahres-Überlebensrate von NB-Patienten von 46% auf 66% verbessert werden konnte (Yu *et al.*, 2010), liegt die Überlebensrate von NB-Patienten mit *MYCN*-Amplifikation, unabhängig vom Stadium und Diagnose-Zeitpunkt, unverändert bei unter 30% (Moroz *et al.*, 2011). Die hohe Mortalität dieser besonders aggressiven Tumoren ist auf die Entwicklung von Chemotherapie-resistenten Rezidiven und fehlenden alternativen Therapieansätzen zurückzuführen (Maris, 2005).

Basierend auf den erfolgreichen klinischen Erfahrungen mit passiven Immuntherapien ist die Erforschung und Entwicklung aktiver Immuntherapiestrategien ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung dieser Erkrankung. Für eine aktive Immuntherapie ist es notwendig, Zielmoleküle zu finden, die entweder tumorspezifisch sind oder vom Tumor überexprimiert werden. Solche Zielmoleküle werden als TSA oder TAA bezeichnet.

Für das Neuroblastom stellt *MYCN* ein außergewöhnlich gutes TAA dar, welches besonders bei aggressiven Neuroblastom-Varianten hoch exprimiert wird und dem T-Zell-Immunsystem zugänglich scheint, da im Blut von Neuroblastom-Patienten mit *MYCN*-Amplifikation *MYCN*-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Sarkar and Nuchtern, 2000). Zudem ist die Expression von *MYCN* im gesunden Gewebe auf die frühe Entwicklungsphase begrenzt, was Autoimmunreaktionen im Verlauf der Therapien nahezu ausschließt. Somit erfüllt dieses Onkogenprodukt alle Charakteristika, die ein TAA als Ziel einer spezifischen aktiven Anti-Tumorthherapie aufweisen sollte (Himoudi *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2010).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit *MYCN*-DNA-Vakzine zur Induzierung einer aktiven Immunantwort gegen *MYCN*-überexprimierende Neuroblastome generiert und ihre Wirksamkeit *in vivo* untersucht. Für die Untersuchungen der Vakzine *in vivo* wurden zuvor zwei neue *MYCN*-NB-Mausmodelle etabliert, welche sich durch eine hohe, induzierbare *MYCN*-Expression auszeichneten (Abschnitt 4.3 und 4.4).

#### 5.1.2 Immuntherapien beim immundefizienten Neuroblastom

Aktive Immuntherapien, die auf einer durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort beruhen, werden bei dem als schwach immunogen geltenden Neuroblastom als wenig erfolgversprechend angesehen. Grund ist die häufig beobachtete verringerte

MHC-Klasse-I-Expression auf Neuroblastomzellen. Diese einseitige Betrachtung spiegelt aber nicht die Fähigkeit der Neuroblastomzellen wider, MHC-Klasse-I-Moleküle in hohem Ausmaß, z.B. nach der Gabe von bestimmten Zytokinen, verstärkt zu exprimieren.

In vielen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen ist die Präsentationsdichte der MHC-Moleküle tatsächlich reduziert, da durch MycN die Expression der p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B gehemmt wird. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der sich im Endoplasmatischen Retikulum befindlichen Aminopeptidasen ERAP1 und ERAP2, welche für die Generierung der MHC-Klasse-I-Bindepeptide verantwortlich sind (Forloni *et al.*, 2010). Die geringe Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen stellt dabei einen *immune escape*-Mechanismus dar, der eigentlich gegen den Erfolg einer auf CTL beruhenden Immuntherapie spricht. Doch die MHC-Gene sind nur herunterreguliert, nicht abgeschaltet oder defekt, wodurch die Möglichkeit besteht, sie durch Zytokine oder Chemokine, wie z.B. IFN- $\gamma$ , IL-18 und/oder IL-2, zu reaktivieren, wie es bereits mit humanen und auch murinen Neuroblastomzellen gezeigt wurde (Boes *et al.*, 1994; Pertl *et al.*, 2001; Neal *et al.*, 2004).

Zudem wurde bewiesen, dass bei hochaffinen CTL bereits 10 bis 100 Liganden/MHC-I-Komplexe ausreichen, um eine spezifische CTL-vermittelte Lyse von Zellen zu induzieren (Christinck *et al.*, 1991; Sykulev *et al.*, 1996). So reichte z.B. bei Influenza-infizierten C1300-NB41A3-Zellen die reduzierte Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen aus, um eine durch Impfung induzierte, spezifische Lyse mittels CTL zu bewirken (Spierings *et al.*, 2000). Somit ist nicht nur die Menge der MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Zellen für die Induktion einer effektiven Immunantwort ausschlaggebend, sondern auch die Affinität der induzierten T-Zellen gegenüber den jeweiligen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Liganden.

## 5.2 *MYCN*-spezifische DNA-Vakzine

Um eine effektive, hochaffine Immunantwort gegen *MYCN*-exprimierende Zellen zu induzieren, wurden in dieser Arbeit unterschiedliche *MYCN*-DNA-Vakzine generiert und untersucht. Ein Vakzin wurde aus der gesamten *MYCN*-cDNA generiert, wodurch nach Applikation, je nach Prozessierung durch das Proteasom, eine Vielzahl unterschiedlicher Epitope des MycN-Proteins in MHC-Molekülen präsentiert wurden. Zwei weitere Vakzine wurden aus jeweils drei ausgewählten Epitopen der MycN-Aminosäuresequenz hergestellt, welche die höchsten bzw. geringsten Affinitäten zu dem MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> aufwiesen. Bei der Auswahl der Epitope war der MHC-Typ der Patienten bzw. der Mäuse ausschlaggebend, da jedes Epitop unterschiedliche Affinitäten zu den jeweiligen Allel-Typen der MHC-Klasse-I-Moleküle aufweist. So bindet z.B. das in dieser Arbeit verwendete Peptid EDAPPQKKI sehr stark an den MHC-Typ H2-K<sup>k</sup>, aber nur schwach an den ebenfalls in der

A/J-Maus vorkommenden MHC-Typ H2-K<sup>d</sup> (Norda *et al.*, 1993; Burrows *et al.*, 1996; Kellenberger *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit verwendeten Minigen-Epitope wurden unter Zuhilfenahme der Datenbanken *syfpeithi*, RANKPEP und BIMAS ausgewählt (Tab. 4.1) (Nussbaum *et al.*, 2003). Mit Hilfe dieser Datenbanken wurden jeweils drei Epitope aus der Aminosäure-Sequenz von MycN ermittelt, die die höchste bzw. die geringste Affinität zu dem MHC-Klasse-I-Molekül H2-K<sup>k</sup> aufwiesen. Aus diesen Sequenzen wurden dann Minigen-Vakzine gestaltet (exemplarisch, Abb.4.1.1). Dabei wurden die Epitope mit speziellen *Spacer*-Peptiden ligiert, die eine Spaltung der Minigene durch das Proteasom an eben diesen Stellen provoziert. Damit sollte eine Prozessierung innerhalb der Epitope vermieden und ihre Präsentation sichergestellt werden (Velders *et al.*, 2001). Die hergestellten Vakzine wurden als pMDV1 (MYCN<sup>High</sup>), MYCN<sup>Low</sup> (Negativ-Kontrolle) und das *full-length*-Vakzin als MYCN-cDNA bezeichnet.

Um eine gleichmäßige Epitop-unabhängige Degradierung der Impfstoffe durch das Proteasom und dadurch eine erhöhte Präsentation der Epitope in MHC/-Peptid-Komplexen auf APC zu erreichen, wurden die generierten Minigene bzw. die MYCN-cDNA in das Expressionsplasmid pCMV-F3Ub ligiert. Dieses Plasmid beinhaltet eine der *multiple cloning side* (MCS) vorgeschaltete Ubiquitin-Sequenz, die bei Expression zu einem ubiquitinierten Fusions-Peptid (Ubiquitin+Vakzin) führt, welches bevorzugt durch das Proteasom prozessiert wird und dadurch die Präsentation der Antigene in MHC/Peptid-Molekülen auf APC verstärkt (Grant *et al.*, 1995; Velders *et al.*, 2001; Malynn and Ma, 2010).

Eine Besonderheit der Ubiquitinsequenz dieses Vektors ist eine C-terminale eingefügte Mutation. Hierbei handelt es sich um den Austausch der AS Gly<sub>76</sub> gegen Ala<sub>76</sub> im Vergleich zur wt-Sequenz (Huebener *et al.*, 2008). Diese Veränderung trägt zur Stabilisierung des Ubiquitinfusionspeptids bei, indem sie den Verdau durch sogenannte DUB's (*deubiquitinating enzymes*) erschwert (Ecker *et al.*, 1989; Martinez *et al.*, 2009). Diese deubiquitinierenden Enzyme dienen dem Recycling von Ubiquitin. Sie schneiden entstehende Polyubiquitinketten nach jedem Gly<sub>76</sub> in ihre Monomere und verhindern damit eine Poly-Ubiquitinierung der Peptide (Wilkinson, 1997; Amerik and Hochstrasser, 2004; Martinez *et al.*, 2009). Durch den Einbau der stabilisierenden AS Ala<sub>76</sub> wird somit die Entstehung von Polyubiquitinketten erleichtert und der proteasomale Abbau der Peptidketten gefördert, der Voraussetzung für eine effektive Generierung von MHC-I/Peptid-Komplexen ist (Rodriguez *et al.*, 1999).

Da sich im mukosalen Gewebe des Magen-Darm-Traktes ca. 50% aller Immunzellen befinden, stellt dieses Gewebe das perfekte Ziel einer Vakzinierung dar (Holmgren and Czerkinsky, 2005; Anjuere and Czerkinsky, 2007). Aus diesem Grund wurden die generierten DNA-Vakzine oral appliziert. Als Applikationsvehikel wurden attenuierte

Salmonellen des Stammes *Salmonella typhimurium* SL7207 verwendet, die sich als bestes DNA-Vakzin-Vehikel zur Bekämpfung des NB bewährt haben (Berger *et al.*, 2013). Diese fakultativ intrazellulär pathogenen Bakterien gehören zur Gruppe *Salmonella enterica*, denen auch der Bakterien Stamm Ty21a (*Salmonella enterica* Seroovar *typhi*) angehört, der routinemäßig bei der Typhus-Impfung eingesetzt wird (Marathe *et al.*, 2012). Die pathogenen wt-Stämme gelangen bei Nahrungsaufnahme in den Magen-Darm-Trakt und rufen dort eine Gastroenteritis hervor. Aufgrund von Gewebstropismus infiltrieren die Salmonellen dabei spezifisch die in den mukosalen Oberflächen angesiedelten APC, also das eigentliche Ziel oral applizierter Vakzine (Mollenkopf *et al.*, 2001). Um den pathologischen Verlauf der Bakterien zu unterbinden, wurde den verwendeten *S. typhimurium* SL7207 eine *aroA*-Deletion beigefügt, die zur Unterbrechung der Synthese aromatischer Aminosäuren führt und die Vermehrung der Bakterien verhindert (Hoiseth and Stocker, 1981).

Neben dem Gewebetropismus bieten diese Salmonellen weitere wichtige Eigenschaften, die beim Einsatz bei immuntherapeutischen Behandlungsstrategien ausgenutzt werden. Durch ihre pathogen-assoziierten Muster (PAMPs) rufen sie eine zusätzliche Stimulierung des Immunsystems hervor, welche gerade bei Tumoren mit schwacher Immunogenität entscheidend sein kann (Dietrich *et al.*, 2003; Gardlik and Fruehauf, 2010). Die Salmonellen bestehen aus immunstimulatorischen Molekülen wie Peptidoglykanen, Lipopolysacchariden und Flagellin, die in Verbindung mit den unmethylierten CpG-Inseln der integrierten DNA-Vakzine als fremd erkannt werden und dadurch die Vakzinierung gegen Selbstantigene wie MYCN erst ermöglichen (Krieg, 2000). Denn durch die PAMPs wird zusätzlich eine über die Toll-like-Rezeptoren (TLR) vermittelte Stimulierung des angeborenen Immunsystems erreicht und ein Th1-lastiger Arm des adaptiven Immunsystems induziert (Krieg, 2007). Dabei wird das angeborene Immunsystem zur Expression von Zytokinen, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  angeregt, was sich schließlich auch auf das adaptive Immunsystem auswirkt (Medzhitov and Janeway, Jr., 1999). Zusätzlich wird durch die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  der Aufbau des Immunoproteasoms gefördert, was wiederum zu einer Zunahme der MHC/Epitop-Komplexe führt und in einer verstärkten Immunantwort endet (Boes *et al.*, 1994). Die aufgeführten Faktoren sind ein wichtiger Bestandteil der Vakzinierung, denn zu guter Letzt tragen sie entscheidend zur Überwindung der peripheren Toleranz bei und ermöglichen erst die Induzierung einer gegen ein Selbstantigen gerichteten aktiven Immunantwort.

### 5.3 *In-vivo*-Modelle zur Untersuchung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien beim NB

Neue Therapieansätze zur Behandlung des NB werden häufig in immundefizienten Xenograft-Mausmodellen getestet, die für die Erforschung immuntherapeutischer Ansätze jedoch ungeeignet sind. Für die Untersuchung aktiver immuntherapeutischer Behandlungsstrategien gegen Tumoren bedarf es Mausmodelle, die immunkompetent sind und im Idealfall ein vergleichbares Tumor-Wachstum aufweisen wie es bei NB-Patienten zu beobachten ist (Patterson *et al.*, 2011; Teitz *et al.*, 2011).

Ein häufig verwendetes immunkompetentes *MYCN*-überexprimierendes NB-Mausmodell ist die TH-*MYCN*-Maus (Weiss *et al.*, 1997). Durch ein hinter einem Tyrosin-Hydroxylase-(TH)-Promotor kloniertes *MYCN*-Transgen entwickeln diese immunkompetenten Mäuse spontan Neuroblastome, die mit denen humaner Patienten vergleichbar sind. So entwickeln ca. 30% aller hemizygoten Tiere in einem Zeitraum von vier Monaten NB. Homozygote Mäuse erkranken zu 100% an NB, was bei diesen Tieren nach spätestens vier Monaten zum Tode führt (Chesler and Weiss, 2011). Bei diesem Tiermodell besteht neben der direkten Anwendung der TH-*MYCN*-Tiere auch die Möglichkeit, isolierte TH-*MYCN*-NB-Zelllinien aus den transgenen Tieren in Verbindung mit den syngenischen Mausstämmen (C57BL/6J oder 129X1/SvJ) zu verwenden (Cheng *et al.*, 2007).

Ein anderes hoch *MYCN*-exprimierendes immunkompetentes Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe JH Schulte vorgestellt. Durch ein LIN28B-Transgen entwickeln diese Tiere spontan Neuroblastome die sich durch eine geringe Menge von let-7 miRNA und eine hohe Expression des MycN-Proteins auszeichnen (Molenaar, 2012).

Zwei weitere Modelle, die ebenfalls häufig Anwendung bei der Erforschung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien des NB finden, sind die NB-Zelllinien NXS2 und C1300 mit syngenen Charakter zu A/J-Mäusen (Lode *et al.*, 1997a). Die Tiere dieses ektopen Transplantationsmodells sind immunkompetent, und Tumoren können durch i.v.- oder s.c.-Injektion der genannten Zelllinien initiiert werden. Durch die Möglichkeit der Tumoringjektion ist ein relativ kurzer Versuchsablauf von vier bis sechs Wochen zu erreichen, der mit vielen Tieren zum gleichen Zeitpunkt begonnen werden kann. Darüber hinaus zeichnet sich das NXS2-Modell durch eine spontane Metastasierung aus; nach s.c.-Initiierung und operativer Entfernung der Primärtumoren bilden diese Tiere spontan Metastasen, deren Lokalisation und Verhalten mit denen von NB-Patienten vergleichbar sind. So bietet dieses Modell bei s.c.-Injektion zwei messbare Parameter: primäres Tumorstadium bzw. Tumorgewicht und den Grad der spontanen Metastasierung. Dieses Modell wurde bereits in verschiedenen immuntherapeutischen Untersuchungen erfolgreich

eingesetzt (Lode *et al.*, 2000; Fest *et al.*, 2009; Gil *et al.*, 2009; Huebener *et al.*, 2009a; Soto *et al.*, 2011).

Da in unserem Labor bereits viel Erfahrung mit den NXS2-/C1300-Mausmodellen gesammelt werden konnte, die Versuche zeitlich schneller durchzuführen sind und bereits für Untersuchungen aktiver DNA-Impfstrategien verwendet wurden, sollten die in dieser Arbeit generierten MYCN-DNA-Vakzine in diesen Modellen analysiert werden. Da beide Zelllinien aber nur eine geringe MYCN-Expression aufweisen, wurden NXS2 und C1300-Zelllinien etabliert, die sich durch eine hohe stabile, induzierbare MYCN-Expression auszeichnen und sich somit auch für Untersuchungen MYCN-basierter Immuntherapien eignen.

#### **5.4 Etablierung der MYCN-exprimierenden NXS2/C1300-Zelllinien**

Mit der Etablierung beider MYCN-Mausmodelle wurden zu A/J-Mäusen syngene MYCN-exprimierende C1300- und NXS2-Zelllinien hergestellt, die zum Teil eine systematische Regulierung der MYCN-Expression *in vitro* und *in vivo* ermöglichte.

Kommerziell sind Tet-on- und Tet-off-Vektorsysteme erhältlich, die durch Zugabe von Tetracyclin-Derivaten, wie Doxycyclin, die Expression eines gewünschten Transgens induzieren (Tet-on) oder blockieren (Tet-off) (Berens and Hillen, 2004; Stieger *et al.*, 2009).

Da die zu etablierenden Zelllinien nur innerhalb eines verhältnismäßig kurzen Zeitraums, während der Durchführung der *in-vivo*- und *in-vitro*-Experimenten, hohe MYCN-Expressionen aufweisen mussten, wurde das Tet-on-Vektorsystem T-REx™ von Invitrogen verwendet. Dieses auf zwei Vektoren beruhende System, bestehend aus einem Repressorplasmid und dem *gene of interest* (GOI- hier MYCN) tragenden Expressionsplasmid, ermöglicht die Induktion des Transgen *in vitro* als auch *in vivo* (siehe Abschnitt 3.5.5).

Für die Herstellung der Transfektanten wurden die wt-Zellen C1300 und NXS2 zunächst stabil mit dem Repressorplasmid pcDNA6/TR® transfiziert und eine ausreichende Expression des Repressormoleküls mit Hilfe eines Luciferase-Assays verifiziert (Abb. 4.3.1). Nach Auswahl geeigneter Repressorplasmid-tragenden Zellklone, wurden diese stabil mit dem MYCN-Expressionsplasmid pCDNA4/TO-MYCN transfiziert. Nach einer Antibiotikaselektion und Anreicherung von Einzelzellen, wurde die Integration der MYCN-cDNA in das Genom dieser Zellen verifiziert (Abb. 4.3.3). Anschließend erfolgte die Auswahl der Transfektanten anhand von TaqMan q-PCR-Analysen. Es wurden schließlich die beiden Transfektanten ausgewählt, die die größte Differenz zwischen basaler und induzierter Expression aufwiesen (Abb. 4.3.4). Diese Zellen wurden im weiteren Verlauf als C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 bezeichnet.



Bei der Charakterisierung der Klone mit Hilfe von Western-Blot-Analysen, wurde eine *leakiness* des NXS2-MYCN-1-Klons festgestellt; eine hohe MycN-Protein-Expression auch im nicht induzierten Zustand (Abb. 4.3.4, 4.3.5 und 4.4.2). Die Ursachen für eine *leakiness* regulierbarer Zellsysteme können sehr unterschiedlich sein; Sie entstehen unter anderem durch klonale Effekte während der stabilen Transfektion des Expressionsplasmids (hier pCDNA4/TO) ins Chromatin (Mizuguchi and Hayakawa, 2001). Dabei kommt es durch die Integrationsstellen, -Art und -Anzahl der in die Chromosomen integrierten Vektoren zu einer vom Tet-Repressor unabhängigen Expression des Zielgens (Rennel and Gerwins, 2002). Des Weiteren kann eine Autoaktivität des Tet-responsiven Promotors, welche durch starke Promotor- bzw. Enhancersequenzen entsteht, eine Expression des Transgens, auch in Abwesenheit von Doxycyclin, hervorrufen (Gossen and Bujard, 2002).

Da die Auswahl der beiden Transfektanten anhand von TaqMan q-PCR-Analysen getroffen wurde und beide Zelllinien eine geringe basale *MYCN*-RNA-Expression aufwiesen, scheinen auch posttranslationale und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen in NXS2-MYCN-1 zur Akkumulation des MycN-Proteins beizutragen (Gry *et al.*, 2009). Ein vergleichbares Phänomen tritt auch bei einigen NB-Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation auf; trotz normaler Anzahl des *MYCN*-Gens weisen die Tumoren eine bis zu 50fach erhöhte Menge des MycN-Proteins auf (Nisen *et al.*, 1988). Die Akkumulation von MycN wird dabei von einem posttranskriptionalen Mechanismus über MDM2 vermittelt, der zur Stabilisierung des Proteins beiträgt (Gu *et al.*, 2012). Die hohe Menge von MycN in diesen Tumoren stellt aber keinen prognostischen Marker für das NB dar, wie die Amplifikation des *MYCN*-Gens (Westermarck *et al.*, 2011).

Die stabile Integration des Transgens und dessen Expression äußerte sich in den Transfektanten durch eine beschleunigte Proliferation (Abb. 4.4.4). Durch MycN werden, wie auch für c-Myc bekannt, hauptsächlich Gene induziert, die für die Proliferation und den Wiedereintritt ruhender (quieszenter) Zellen in den Zellzyklus verantwortlich sind (Ryan and Birnie, 1996; Burgin *et al.*, 1998). Mit Hilfe von SYBR Green q-PCR- und Western-Blot-Analysen wurden gezeigt, dass die Proliferation der Zelllinien mit der *MYCN*-Expression korreliert und durch Expressionsveränderungen bekannter Zellzyklus-relevanter Zielgene hervorgerufen wird (Abschnitt 4.4.5 und 4.4.6). Dabei äußerte sich bereits die geringe basale, aber besonders die durch Doxycyclin induzierte Expression von *MYCN* in beiden Transfektanten in erhöhten Mengen von p53, p21<sup>WAF1</sup>, MDM2 und Aurora A. Diese Gene stellen sowohl direkte, als auch indirekte Zielgene von *MYCN* dar, haben entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus und damit auch auf die Proliferation (Bell *et al.*, 2007; Chesler *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2009).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe Expression von *MYCN* mit einer Akkumulation des Zellzyklus- und Tumorsuppressorgens p53 korreliert und dies über eine

direkte Regulation von p53 durch MycN oder eine indirekte durch MDM2 vermittelt wird (Slack and Shohet, 2005; Chen *et al.*, 2010). Bei dem zweiten Weg wird die Stabilisierung von p53 über den MDM2 - p14<sup>ARF</sup>-Signalweg hervorgerufen, der einen Schutz vor MYC-induzierten Tumoren darstellen könnte und bereits für c-MYC und L-MYC beschrieben wurde (Eilers, 1999; Eischen *et al.*, 1999). Durch die so entstehende Akkumulation von p53 in MYCN-amplifizierten Tumoren wird die Expression des CDK-(*cyclin-dependent kinase*) Inhibitor-1 (p21<sup>WAF1</sup>) herabreguliert, wodurch der G1-Arrest in diesen Zellen gestört wird und sie unkontrolliert proliferieren können (Bell *et al.*, 2007). Normalerweise wird durch p21<sup>WAF1</sup> die Aktivität des Zyklin-E/CDK2-Komplexes inhibiert, wodurch ein G1-Arrest nach DNA-Schädigung ausgelöst wird (Sherr and Roberts, 1999).

Auch in den neuen etablierten Zelllinien ist eine Akkumulation von p53 nach MYCN-Induktion festzustellen. Diese führt zu einer erhöhten Expression von MDM2, die E3 Ubiquitin-Ligase, die für die Ubiquitinierung von p53 und für die Halbwertszeit des Proteins verantwortlich ist (Tweddle *et al.*, 2003; Eischen and Lozano, 2009). Aufgrund der verstärkten Aktivität von MDM2 wurde auch eine erhöhte Menge des gespaltenen MDM2-Produkts in den Transfektanten nach MYCN-Induktion nachgewiesen, die die erhöhte Interaktion zwischen MDM2 und p53 widerspiegelt (Pochampally *et al.*, 1998; Pochampally *et al.*, 1999) (Abb. 4.4.7).

Eine weitere Folge von MYCN-Amplifikationen ist die Stabilisierung von Aurora A, die ebenfalls in den etablierten Transfektanten nach MYCN-Induktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.4.5 und 4.4.6). Aurora A ist während des Zellzyklus für den Übergang von der G2- zur M-Phase essentiell und wird für die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates während der Zellteilung benötigt (Ouchi *et al.*, 2004; Sasai *et al.*, 2008). Neben diesen Funktionen konnte gezeigt werden, dass Aurora A indirekt zur Stabilisierung von MycN beiträgt, indem es die Ubiquitin-vermittelte Degradierung des Proteins durch das Proteasom verhindert (Otto *et al.*, 2009).

Die indirekt durch MYCN vermittelte Repression von p21<sup>WAF1</sup> konnte bei C1300-MYCN-A und NXS2-MYCN-1 nicht beobachtet werden; in beiden Zelllinien wurde eine erhöhte Expression des Proteins nach MYCN-Induktion festgestellt. Anscheinend ist hier ein anderer Mechanismus verantwortlich. Denn trotz hoher p21<sup>WAF1</sup>-Expression zeigen die Transfektanten eine deutliche Sensibilisierung für Apoptose, die bei MYCN-amplifizierten NB-Zellen als Folge einer durch MYCN hervorgerufenen, reduzierten p21<sup>WAF1</sup> Expression diskutiert wird (Bell *et al.*, 2006).

Die Apoptose-Sensibilisierung gegenüber Apoptose-Induktoren wie Doxorubicin oder Interferon- $\gamma$  *in vitro*, ist generell eine typische Eigenschaft MYCN-amplifizierter NB-Zellen (Lutz *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2000), die sich auch in den neu etablierten murinen Zelllinien widerspiegelte. Nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Etoposid und

Vincristin, stieg die prozentuale Apoptoserate der Transfektanten nach *MYCN*-Induktion deutlich an und lag bei den höchsten Therapeutika-Mengen um 50% höher als bei den wt-Zellen unter gleichen Bedingungen (Abb. 4.4.7).

Somit bleibt festzuhalten, dass die neu etablierten Zelllinien vergleichbare Charakteristiken *in vitro* aufwiesen wie humane *MYCN*-amplifizierte NB-Zelllinien.

Für die Vakzinierungs-Experimente mussten die Transfektanten C1300-*MYCN*-A und NXS2-*MYCN*-1 zunächst *in vivo* etabliert werden. Bei diesen Untersuchungen mit A/J-Mäusen bildeten die C1300-*MYCN*-A-Zellen bei gleicher Anzahl intravenös applizierter Tumorzellen, ohne Induktion von *MYCN*, später Metastasen als die wt-Zelllinie. Wurden die Mäuse hingegen mit Doxycyclin haltigem Wasser genährt, entstanden die Metastasen zu ähnlichen Zeitpunkten wie bei der wt-Zelllinie (Abb. 4.5.1). Durch die Integration der Vektoren wird die Manifestation der Tumorzellen und die Bildung von Metastasen verzögert, die aber durch den malignen Charakter von *MYCN* wieder aufgehoben werden kann.

Eine weitere Besonderheit der neu etablierten Zellen wurde am Versuchsende festgestellt; die Metastasierung war auf die Ovarien und vereinzelt auf Lymphknoten beschränkt. Metastasen auf Leber, Nieren und Nebennieren wie bei wt-C1300-Zellen waren nicht aufgetreten. Die durch die integrierten Vektoren veränderte Genexpression in den Transfektanten wirkt sich somit auch auf das Metastasierungsverhalten aus, denn auch NXS2-*MYCN*-1-Zellen metastasierten ausschließlich in die Ovarien. Eine veränderte Expression von Integrinen auf den Zellmembranen der Transfektanten könnte für dieses Phänomen verantwortlich sein und müsste in zukünftigen Experimenten untersucht werden. Aufgrund des neuen Metastasierungsmuster der Transfektanten wurde ein neues *Staging System*, zur Auswertung des Metastasierungsgrades am Versuchsende, entworfen (Tab. 4.5.1).

Bei der Etablierung des NXS2-Transfektanten zeigten die s.c.-injizierten NXS2-*MYCN*-1-Zellen, unabhängig von der *MYCN*-Induktion durch Doxycyclin, ein vergleichbares primäres Tumorwachstum wie die wt-NXS2-Zellen (Abb. 4.5.3). In den nach ca. 14 Tagen operativ entfernten Primärtumoren konnte MycN mittels immunhistologischer Färbungen nachgewiesen werden (Abb. 4.5.4). Dabei wurden keine Unterschiede hinsichtlich Proteininfiltration der NXS2-*MYCN*-1-Tumoren, zwischen Doxycyclin-behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt. Diese Beobachtung bestätigte die bereits *in vitro* festgestellte *leakiness* des Vektorsystems auch *in vivo*, woraufhin im weiteren Verlauf der Arbeit auf die Zugabe von Doxycyclin im Trinkwasser der Tiere verzichtet wurde.

Bei NXS2-*MYCN*-A erwies sich die Anwachsrate der s.c.-injizierten Tumoren als sehr heterogen und nur ca. 50% manifestierten sich in den Mäusen (Abschnitt 4.5.3). Da die NXS2-Zellen syngen zu A/J-Mäusen sind und ein murines Transgen verwendet wurde, sollte eine Immunreaktion gegen das exprimierte MycN-Protein bzw. -Gen ausgeschlossen sein.

Möglicherweise wurde durch die Expression des Zeocin<sup>TM</sup>-Antibiotika-Resistenz-Gens *Sh ble* oder des Repressormoleküls *TetR* eine Antigenität initiiert, die zur Abstoßung der transfizierten Zellen durch das Immunsystem der Mäuse führte (Trastoy *et al.*, 2005). Des Weiteren könnte durch die stabile Integration der T-Rex<sup>TM</sup>-Plasmide eine genetische Veränderung innerhalb der Zellen stattgefunden haben, z.B. durch stark veränderte Genexpressionsmuster, die zum teilweisen Verlust des syngenesischen Charakters gegenüber A/J-Mäusen geführt hat, wodurch ein Großteil der Zellen eine Immunreaktion induzierten und abgestoßen wurden (Stieger *et al.*, 2009; Alonso-Ferrero *et al.*, 2011).

Durch mehrmaliges Passagieren von Tumorzellen in Mäusen kann ihr syngener Charakter zurückgewonnen und die Anwachsrate sowie Aggressivität der Zellen erhöht werden. Aus diesem Grund wurde NXS2-MYCN-1 mehrmals in syngenesischen A/J-Mäusen passagiert und so die Anwachsrate auf über 90% erhöht. Die *MYCN*-Expression der nach jeder Passage isolierten Zelllinien wurde mittels Western-Blot-Analysen *in vitro* verifiziert (Abb. 4.5.6).

Nachdem die Primärtumoren in diesen *in-vivo*-Versuchen operativ entfernt worden waren, wurde die spontane Metastasierung in den Tieren untersucht. Dabei entwickelten alle Mäuse, unabhängig von den injizierten Tumorzellen (wt-NXS2 oder NXS2-MYCN-1) nach ca. 30 Tagen Metastasen. Dabei metastasierten die NXS2-MYCN-1-Zellen, wie bereits bei C1300-MYCN-A beobachtet, ausschließlich in die Ovarien.

Bevor die Wirksamkeit der Vakzine im NXS2-MYCN-1 untersucht wurde, erfolgte die Verifizierung einer ausreichenden H2-K<sup>k</sup>-Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen (vor und nach Passagierung), die Voraussetzung für eine durch die Vakzine induzierte *MYCN*-spezifischen Immunantwort ist.

Bei diesen Untersuchungen wurde eine hohe, mit den wt-Zellen NXS2 und C1300 vergleichbare Anzahl an H2-K<sup>k</sup>-MHC-Molekülen auf den Transfektanten (vor Passagierung) mittels FACS-Analysen nachgewiesen (Abb. 4.4.8). Eine beschriebene inverse Korrelation zwischen hoher *MYCN*-Expression und reduzierter Präsentation von MHC-Molekülen wurde nicht festgestellt (van 't Veer *et al.*, 1993; Forloni *et al.*, 2010).

Während die NXS2-MYCN-1-Zellen in A/J-Mäusen passagiert wurden, konnte diese beschriebene Korrelation beobachtet werden. Durch die Selektion anwachsender Tumorzellen nahm die MycN-Protein-Menge von Passage zu Passage zu und die Anzahl an präsentierten H2-K<sup>k</sup>-Molekülen ab (Abb. 4.5.6 und 4.5.8). Auf den Zellen der vierten Passage wurden nur noch weniger als 50% der Ausgangszahl an MHC-Moleküle präsentiert. Eine Abnahme der MHC-Klasse-I-Moleküle durch Zellvermischungen bei Rekultivierung der Tumorzellen wurde durch Antibiotika-Selektionen mit Zeocin<sup>TM</sup> und Blastidin nach jeder Passage verhindert. Die Selektion von ausschließlich manifestierenden NXS2-MYCN-1-Zellen könnte verantwortlich sein. Diese wird durch die

Korrelation zwischen zunehmender Anwachsrate und abnehmender MHC-Präsentation mit zunehmender Passage bestätigt.

Da bei einer aktiven Immuntherapie auch die Affinität der T-Zellen gegenüber den jeweiligen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Liganden entscheidend ist, war es, wie im weiteren Verlauf zu sehen, trotz der verringerten Anzahl an MHC-Klasse-I-Molekülen auf NXS2-MYCN-1 möglich, eine effektive spezifische Immunantwort gegen diese Zellen zu induzieren (Spierings *et al.*, 2000).

## **5.5 Wirkung der MYCN-DNA-Vakzine *in vivo***

### **5.5.1 MYCN-Vakzine reduzieren primäres Tumorwachstum**

In den folgenden *in-vivo*-Experimenten wurde die Wirksamkeit der generierten MYCN-DNA-Vakzine in beiden Tiermodellen gezeigt und bewiesen, dass die induzierte Immunantwort auf MYCN-spezifische CTL beruht.

Durch Vakzinierung mit pMDV1 und MYCN-cDNA wurde das primäre Tumorwachstum von s.c.-injizierten wt-NXS2- und NXS2-MYCN-1-Tumoren in immunkompetenten A/J-Mäusen, im Vergleich zu Kontroll-Tieren deutlich reduziert (Abb. 4.2.2 und Abb. 4.6.1). Das Primärtumorwachstum von NXS2-MYCN-1 wurde mit Hilfe von pMDV1 sogar sehr signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen reduziert, wodurch die Bedeutung der MYCN-Epitop-Präsentation auf den Zielzellen und die Spezifität der Immunantwort deutlich werden.

Im ersten Tierversuch wurden wt-NXS2-Zellen, also gering MYCN-exprimierende Zellen, in einem prophylaktischen Versuchsablauf, pMDV1 und MYCN-cDNA vakzinieren- sowie MYCN<sup>Low</sup>- und PBS-behandelten A/J-Mäusen s.c. injiziert. Durch die Vakzinierung wurde das Primärtumorwachstum in den pMDV1- und MYCN-cDNA-behandelten Tieren, im Vergleich zu den Kontrollen, deutlich reduziert (Abb. 4.2.2). Da die wt-Zelllinien nur eine geringe Expression von MYCN aufweisen, deutet dies auf eine sehr spezifische Immunantwort hin, die selbst bei geringer Antigen-Epitop-Dichte auf den Zielzellen funktionell ist.

Im zweiten *in-vivo*-Versuch wurde die neu etablierte MYCN-exprimierende NXS2-MYCN-1 Zelllinie A/J-Mäusen injiziert. In diesem Experiment zeigten die pMDV1-geimpften Tiere ein sehr signifikant reduziertes Primärtumorwachstum innerhalb der ersten 13 Tage im Vergleich zu MYCN<sup>Low</sup>-behandelten Mäusen. Mit Hilfe der MYCN-cDNA-Vakzine konnte ebenfalls eine Reduktion der Tumoren erzielt werden. Zudem konnte mit Hilfe von pMDV1 und MYCN-cDNA die Zeitspanne zwischen Tumor-Injektion und chirurgischer Intervention, aufgrund des reduzierten Tumorwachstums, im Vergleich zu den Kontrollen vergrößert werden (Abb. 4.6.2).

Im therapeutischen Versuchsansatz mit C1300-MYCN-A-Zellen wurde ebenfalls eine deutliche Anti-Tumor-Wirkung der MYCN-DNA-Vakzine beobachtet. In diesem Versuch entwickelten die Mäuse, die mit pMDV1 und MYCN-cDNA geimpft wurden, deutlich später Metastasen als Kontroll-behandelte Tiere (Abb. 4.6.4). Die MYCN-cDNA-Vakzinierung unterdrückte die Metastasierung in A/J-Mäusen sogar komplett über den gesamten Versuchszeitraum hinaus. Aufgrund vieler verstorbener Tiere nach i.v.-Tumorapplikation und oraler-Vakzinierung konnten, aufgrund der zu geringen Anzahl, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen berechnet werden.

Insgesamt wiesen alle *in-vivo*-Versuche auf die Induktion einer CTL vermittelten, gegen das Selbstantigen *MYCN* gerichtete, Immunantwort hin, die sehr spezifisch gegen *MYCN*-exprimierende NB-Zellen wirkte und das Wachstum von Primärtumoren sowie Metastasen reduzieren bzw. verzögern konnte.

In den anschließenden *ex-vivo*-Analysen mit den Splenozyten von geimpften Mäusen wurde die Immunantwort genauer charakterisiert und die äußerlich sichtbaren Ergebnisse *in vitro* bestätigt.

### **5.5.2 Die Immunantwort wird durch *MYCN*-spezifische CTL vermittelt**

Im Allgemeinen beruhen aktive Impfungen auf der Verwendung abgeschwächter Viren oder Viruspartikeln, die neben der Effektorphase der Immunabwehr ein immunologisches Gedächtnis induzieren. Dadurch wird eine langanhaltende Immunität gegen die verabreichten Keime entwickelt, die so erfolgreich ist, da es sich bei Viren um Fremdantigene handelt, die ihre Struktur bzw. Oberfläche beibehalten und bei einer erneuten Infektion vom Immunsystem wiedererkannt werden.

Eine aktive Impfung gegen Tumoren steht einer weitaus größeren Herausforderung gegenüber: bei den Zielen der Vakzinierungen handelt es sich um Tumor-assoziierte Selbstantigene, welche oft schwach immunogen sind und sehr heterogen von genetisch instabilen Zellen exprimiert werden (Xiang *et al.*, 2008). Dennoch ist es mit Hilfe von DNA-Vakzinen möglich, eine effektive spezifische zellulär-vermittelte Immunantwort gegen Tumor-assoziierte Selbstantigene zu induzieren. (Huebener *et al.*, 2003; Lode *et al.*, 2004; Huebener *et al.*, 2008; Fest *et al.*, 2009). Dabei weisen die DNA-Vakzine eine vergleichbare Wirkung wie Peptid-Vakzine auf, bieten aber den Vorteil einer einfacheren und günstigeren Herstellung (Feltquate, 1998; Donnelly *et al.*, 2005; Prud'homme, 2005).

Um nachzuweisen, dass die Reduktion des Tumorwachstums durch eine, mit Hilfe der applizierten MYCN-DNA-Vakzine, induzierten *MYCN*-spezifischen Immunantwort erreicht wurde, wurden die Splenozyten der behandelten Mäuse *ex vivo* analysiert. Dabei konnte eine *MYCN*-Spezifität der Lymphozyten pMDV1- und MYCN-cDNA-geimpfter Mäuse im

Vergleich zu Kontrollen mit Hilfe von Zytotoxizitätsassays und IFN- $\gamma$  ELISA nachgewiesen werden (Abb. 4.2.3, 4.2.4, 4.7.1, 4.7.2, 4.7.3 und 4.7.6). So wurden transient *MYCN*-transfizierte NXS2-Zellen sowie die stabil *MYCN*-exprimierenden NXS2-*MYCN*-1-Zellen, von Lymphozyten pMDV1-geimpfter Mäuse, deutlich stärker lysiert (Abb. 4.2.3 und 4.7.2) und zu einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretion angeregt (Abb. 4.2.4 und 4.7.1) als gering *MYCN*-exprimierende wt-NXS2-Zellen.

Im Gegensatz dazu zeigten isolierte Splenozyten von *MYCN*<sup>Low</sup>-behandelten Tieren, sowohl in den Zytotoxizitätsassays als auch in den ELISAs, keine Spezifität gegenüber *MYCN*-exprimierenden Zellen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit Hilfe der generierten Vakzine eine sehr effektive und spezifische CTL vermittelte Immunantwort induziert werden konnte.

Die Hypothese, dass die Verwendung von Minigenen keine Nachteile gegenüber einer *full-length*-Vakzine hat und sich sogar positiv auf die vermittelte Immunantwort auswirken kann, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (An *et al.*, 2000). Neben dem Vorteil, dass nur immunologisch aktive DNA-Epitope anstelle der cDNA eines funktionellen Onkogens verabreicht werden, zeigten die isolierten Splenozyten der Minigen- (pMDV1) behandelten Tiere einen stärkeren Anti-Tumor-Effekt, als Splenozyten aus *MYCN*-cDNA-Vakzin behandelten Mäusen. Obwohl mit dem Minigen-Vakzin pMDV1, nur drei ausgewählte zu dem MHC-Molekül H2-K<sup>k</sup> hoch affine Epitope aus der gesamten *MYCN*-AS-Sequenz appliziert wurden, konnte mit dieser das Tumorwachstum stärker verringert werden, als mit der *MYCN*-cDNA-Vakzine. Dabei wurde bei diesem Impfstoff das gesamte Protein durch das Proteasom prozessiert und demnach eine Vielzahl *MYCN*-spezifischer Epitope auf der Oberfläche von APC präsentiert (vergleichbar *epitope-spreading*) (Hardwick and Chain, 2011). Im Vergleich zu den Minigen-Epitopen scheinen diese aber eine nicht so effektive bzw. affine Immunantwort gegen *MYCN*-exprimierende Zielzellen zu induzieren (Lode *et al.*, 2004). Diese These wird durch die Analyse der Primärtumoren hinsichtlich infiltrierender Lymphozyten bestätigt. In den Tumoren der pMDV1- und *MYCN*-cDNA-behandelten Gruppen wurde eine vergleichbare Anzahl an tumorinfiltrierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezählt, aber das Tumorwachstum pMDV1 behandelter Tiere war deutlich langsamer als in *MYCN*-cDNA geimpften Tieren (Abb. 4.7.4).

Ein Großteil der Immunantwort wurde durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, dieses zeigte eine Blockierung des MHC-Moleküls H2-K<sup>k</sup>, welches für die Bindung von CTL an ihre Zielzellen (in A/J-Maus) und der T-Zell-Aktivierung essentiell ist (Abb. 4.7.3). Wurde H2-K<sup>k</sup> bei *MYCN*-exprimierenden Zellen blockiert, reduzierte sich die Zytotoxizität um mehr als zwei Drittel (55% auf 15%) welches den Anteil zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen darstellt. Die verbliebene gemessene Lyse wird durch unspezifische Bestandteile der Immunantwort wie NK-Zellen, Makrophagen oder Neutrophile vermittelt. Interessanterweise wurden die Zielzellen C1300-

MYCN-A bei abgeschaltetem *MYCN*-Gen, mit und ohne MHC-Blockierung, ähnlich schwach lysiert wie die *MYCN*-exprimierenden Zellen mit geblocktem H2-K<sup>k</sup>, wodurch der Anteil der spezifisch vermittelten Zytotoxizität gegenüber *MYCN*-präsentierenden Zellen bestätigt wird. Mit Hilfe der Mammakarzinom-Zelllinie SCK, die ebenfalls syngen zu A/J-Mäusen ist, das MHC-Molekül H2-K<sup>k</sup>, aber keine *MYCN* exprimiert (Abb. 4.7.5), wurde im Anschluss gezeigt, dass die durch pMDV1 aktivierte Immunantwort, auf die in dem Minigen-Vakzin pMDV1 verwendeten MycN-Epitopen basierte. So lysierten ausschließlich Splenozyten aus pMDV1-geimpften Tieren nur SCK-Zellen die mit den Minigen-Epitopen beladen waren. Gegenüber unbehandelten Zellen zeigten sie keine Zytotoxizität. Splenozyten der MYCN<sup>Low</sup>-Kontrolle lysierten weder beladene noch unbehandelte SCK-Zellen (Abb. 4.7.6).

Auch diese Ergebnisse beweisen, dass durch die pMDV1-Impfung eine *MYCN*-spezifische Immunantwort initiiert wurde, die auf Minigen-Epitop-spezifische CTL beruht.

Ferner wurde gezeigt, dass eine effektive Immunantwort unabhängig von der Anzahl präsentierter MHC-Moleküle auf den Zielzellen ist. Entscheidend ist die Affinität der Lymphozyten gegenüber den präsentierten MHC-Epitop-Komplexen (Khanna, 1998). So wurden NXS2-MYCN-1-Zellen der vierten Passage, obwohl sie eine geringere Anzahl an MHC-Moleküle aufwiesen, genauso stark im Zytotoxizitätsassay durch Lymphozyten der pMDV1-behandelten Tiere lysiert, wie transient *MYCN*-transfizierte wt-NXS2-Zellen, die über eine höhere H2-K<sup>k</sup>-Dichte auf ihrer Zelloberfläche verfügten. Splenozyten aus MYCN<sup>Low</sup>-behandelten Tieren zeigten hingegen gegenüber allen Zielzellen, unabhängig von *MYCN*, eine stets vergleichbare geringe Zytotoxizität und bestätigen damit die Hypothese, dass die Affinität der Minigen-Epitope entscheidend ist.

## 5.6 Ausblick

Die Experimente dieser Arbeit bestätigen die Hypothesen die zur Herstellung der *MYCN*-DNA-Vakzine berücksichtigt wurden und zeigen, dass mit Hilfe einer *MYCN*-spezifischen Vakzine eine effektive Immunantwort gegen das als besonders schwach immunogen geltende NB induziert werden kann. Diese ist in der Lage das Primärtumorstadium und primär Metastasen von *MYCN*-exprimierenden Zellen signifikant zu unterdrücken. Da *in vivo* *MYCN*-exprimierende NB, neben der schwachen Immunogenität, ein besonders aggressives Tumorstadium aufweisen, sind die Ergebnisse sehr viel versprechend, wobei deutlich zwischen NB-Patienten und Mausmodell unterschieden werden muss.

In beiden Modellen ist es nicht gelungen, die Metastasierung über einen längeren Zeitraum zu unterbinden. Um die Effektivität und Langzeitwirkung der DNA-Vakzine zu verbessern, kann über eine Applikation von Adjuvantien, Zytokinen oder Chemokinen, wie z.B. IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 oder IFN- $\gamma$  nachgedacht werden. Diese sind in der Lage, die Induktion einer



Immunantwort deutlich zu verbessern (Niethammer *et al.*, 2001; Croce *et al.*, 2005; Croce *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008; Croce *et al.*, 2012). So konnte bei der Verwendung anderer Vakzine gezeigt werden, dass es mit Hilfe von IFN- $\gamma$  möglich ist, die Anzahl der präsentierenden MHC-Moleküle auf den Tumorzellen zu erhöhen, wodurch eine Verlängerung der TH1-vermittelten Immunantwort erreicht werden kann (Lampson and George, 1986; Lorenzi *et al.*, 2012). Besonders interessant ist sicherlich auch die Beobachtung, dass eine Co-Expression von IL-18 in einem DNA-Vakzin die Präsentation von spezifischen Antigenen auf DC verstärkt und die Dauer der Immunantwort verlängert. Dabei beruhte die Anti-Tumor-Aktivität von IL-18 in erster Linie auf der Aktivierung von T- und NK-Zellen und die Hochregulierung von MHC-Klasse-I-Antigenen. Dadurch wird die Differenzierung von CD4 T-Helferzellen in Richtung Th1-Helfer-Zellen begünstigt, welche das proinflammatorische Zytokin IL-2 und Interferon IFN- $\gamma$  sezernieren. Dieses wiederum erhöht die Proliferation und/oder Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen, die dann gemeinsam gegen den Tumor wirken (Xiang *et al.*, 2008). Eine weitere Möglichkeit eine dauerhafte Inhibierung von Metastasen in diesen A/J-Mausmodellen zu erreichen, wäre die Gabe der Vakzine über einen längeren Zeitraum immer wieder zu wiederholen, wie es bereits in A/J-Mäusen gezeigt wurde (Huebener *et al.*, 2009a). Es ist also möglich, die in dieser Arbeit beobachtete Wirkung der MYCN-DNA-Vakzine noch zu verbessern, um eine langanhaltende und sehr effektive MYCN-spezifische Immunantwort *in vivo* zu induzieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine MYCN-DNA-Vakzinierung erfolgreich zur Behandlung des NB im Mausmodell eingesetzt werden kann. Vor dem Hintergrund der Beschreibung MYCN-spezifischer T-Zellen bei NB-Patienten (Sarkar and Nuchtern, 2000) und der lytischen Wirkung autologer T-Zellen auf MYCN-exprimierende Zellen (Himoudi *et al.*, 2008), ist das Potential dieser Vakzine auch mit Blick auf eine klinische Entwicklung zu sehen.

## Zusammenfassung

Das Neuroblastom (NB) zählt nach wie vor zu den therapieresistentesten Tumoren des Kleinkindalters. Besonders NB-Patienten mit *MYCN*-Amplifikationen sind mit einer schlechten Prognose konfrontiert. Die hohe Mortalität dieser besonders aggressiven Tumoren ist auf die Entwicklung von Chemotherapie-resistenten Rezidiven und fehlenden alternativen Therapieansätzen zurückzuführen. Eine spezifische aktive Immuntherapie gegen *MYCN* könnte ein vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung dieser malignen Erkrankung darstellen, da bereits in NB-Patienten *MYCN*-spezifische T-Zellen in PBMC nachgewiesen werden konnten. Dieses spricht für das Vorkommen von selbstreaktive, gegen dieses Antigen gerichtete Immunzellen im humanen System.

Für die Untersuchung dieser Hypothese wurden *MYCN*-spezifische DNA-Vakzine generiert, die zur Induktion einer *MYCN*-spezifischen Immunantwort genutzt werden sollten. Dazu wurde ein sogenanntes Minigen-Vakzin, welches für ausgewählte Peptide aus der *MYCN*-AS-Sequenz kodiert und eine *full-length*-Vakzine aus der gesamten MycN-Aminosäure-Sequenz generiert. Zur Sicherstellung der Antigen-Epitop-Präsentation der Vakzine in MHC-Molekülen wurden diese in einen Vektor ligiert (pCMV-F3Ub), welcher bei Expression zu einem ubiquitinierten Fusionspeptid führt und eine proteasomale Degradierung der Vakzine fördert, die als Voraussetzung für die Antigenpräsentation gilt. Als orales Applikationsvehikel wurden attenuierte *Salmonella typhimurium* SL7207 verwendet, die eine zusätzliche Stimulierung des mukosalen Immunsystems hervorrufen.

Für die Untersuchung der Vakzine wurden zuvor zwei neuartige immunkompetente *MYCN*-exprimierende NB-Mausmodelle etabliert. Dazu wurden die syngen NXS2/C1300 A/J-Mausmodelle soweit modifiziert, dass sie über eine induzierbare *MYCN*-Expression verfügten. So wurden die Wildtyp (wt)-Zelllinien NXS2 und C1300 stabil mit einem Doxycyclin-induzierbaren *MYCN*-tragenden Vektorsystem transfiziert und nach Auswahl geeigneter Transfektanten *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

Nach Etablierung der Zelllinien (NXS2-MYCN-1 und C1300-MYCN-A) wurden die Vakzinierungsexperimente mit den *MYCN*-DNA-Vakzinen *in vivo* durchgeführt. Dabei konnte das Primärtumorwachstum von NXS2-MYCN-1 in geimpften Tieren signifikant im Vergleich zu den Kontrollen reduziert werden. Zudem konnte in einem weiteren Versuch die Metastasierung durch C1300-MYCN-A Zellen in A/J-Mäusen mit Hilfe der Impfungen verzögert werden.

Mit der den *in-vivo*-Versuchen anschließenden Analysen wurde schließlich bewiesen, dass die Immunantwort durch tumorinfiltrierende *MYCN*-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wird. Ferner wurde mit den Untersuchungen gezeigt, dass eine aus drei ausgewählten MycN-Epitopen generierte DNA-Vakzine eine effektivere Immunantwort

induziert und das Tumorwachstum stärker reduzieren kann als ein aus der gesamten Antigensequenz generiertes Vakzin.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine MYCN-DNA-Vakzinierung erfolgreich zur Behandlungen *MYCN*-exprimierender NB im Mausmodell eingesetzt werden kann.

Vor dem Hintergrund der Beschreibung *MYCN*-spezifischer T-Zellen in NB-Patienten, der lytischen Wirkung autologer T-Zellen auf *MYCN*-exprimierende Zellen und der Ergebnisse dieser Arbeit, ist das mögliche Potential einer aktiven Immuntherapie gegen *MYCN* als alternativer Therapieansatz zu sehen.

## Summary

Neuroblastoma remains one of the most resistant tumors in infancy. Especially prognosis for NB patients with *MYCN* amplifications are poor. The development of multi-drug-resistant relapses and the lack of alternative therapeutic strategies targeting NB are responsible for the high mortality of these aggressive tumors.

The transcription factor and proto-oncogene *MYCN* was identified as a potential specific target for NB treatment. Additionally, *MYCN*-specific cytotoxic T cells were found in NB patients with amplified *MYCN*-Gens suggesting that the human immune system is self-reactive against this antigen.

This observation led to the hypothesis that an active Immunotherapy with minigene DNA-vaccines targeting *MYCN* is a promising approach to treat this malignant phenotype of NB. Therefore, we investigated the efficacy of three *MYCN*-specific DNA vaccines. Two minigene vaccines were generated; each encoded for three selected epitop-peptides of the MycN amino acid sequence with the highest, or as a control lowest, predicted affinity to the MHC-Class-I Molecule H2-K<sup>k</sup>. The third vaccine based on the full-length cDNA of MycN.

To ensure the antigen epitope presentation in MHC molecules, the constructs were ligated in the vector pCMV-F3Ub which leads to an expression of an ubiquitinated fusion peptide and promotes proteasomal degradation, a prerequisite for antigen presentation.

*Salmonella typhimurium* SL7207 were used as oral application vehicle for the vaccines in *in vivo* experiments to induce an additional stimulation of the mucosal immune system.

To investigate the immunotherapeutic approach new *in vivo* models overexpressing *MYCN* were established. For this purpose NXS2- and C1300-cells syngeneic to immunocompetent A/J-mice were stably transfected with a tetracycline inducible vector system. The transfectants were characterized and established *in vitro* and *in vivo*.

Vaccination with the *MYCN*-DNA vaccines resulted in effectively reduced primary tumor growth or decelerated metastatic spread in *MYCN*-overexpressing syngeneic A/J mouse models. In detail, primary tumor growth of *MYCN*-NXS2-1 was significantly reduced in vaccinated animals compared to control groups. Also, in this experiment the generated vaccine from three selected MycN epitopes were capable of inducing a more effective immune response and a higher reduction in tumor growth compared to the vaccine generated from the entire antigen sequence.

Additionally, vaccination delayed the metastatic spread of C1300-*MYCN*-A in A/J mice.

The immune responses in the *in vivo* experiments followed by orally applied *MYCN*-DNA vaccines was mediated by tumor infiltrating cytotoxic CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells. *MYCN* specificity of infiltrating lymphocytes was verified by *MYCN*-specific cytolytic activity and IFN- $\gamma$  secretion *ex vivo*. Finally, we showed that blocking of MHC-class I molecule H2-K<sup>k</sup>

approved cytotoxicity mediated by CD8<sup>+</sup> T cells, indicating *MYCN* specificity of the induced immune response.

In summary, we showed that a *MYCN* based DNA vaccination strategy is effective against *MYCN*-expressing NB *in vivo*. In light of the description of *MYCN*-specific T cells in NB patients, the lytic action of autologous T cells on *MYCN*-expressing cells and the results of this study underline the possible potential of an active immunotherapy against *MYCN* as an alternative therapeutic approach to treat NB.

## Literaturverzeichnis

- Alonso-Ferrero ME, Valeri A, Yanez R, *et al.* Immunoresponse against the transgene limits hematopoietic engraftment of mice transplanted in utero with virally transduced fetal liver. *Gene Ther* 2011; 18 (5):469-78.
- Alt FW, DePinho R, Zimmerman K, *et al.* The human myc gene family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 2:931-41.
- Aly HA. Cancer therapy and vaccination. *J Immunol Methods* 2012; 382 (1-2):1-23.
- Amati B, Land H. Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4 (1):102-8.
- Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J* 1993; 12 (13):5083-7.
- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, *et al.* International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 2009; 100 (9):1471-82.
- Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1695 (1-3):189-207.
- An LL, Rodriguez F, Harkins S, Zhang J, Whitton JL. Quantitative and qualitative analyses of the immune responses induced by a multivalent minigene DNA vaccine. *Vaccine* 2000; 18 (20):2132-41.
- An LL, Whitton JL. A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *J Virol* 1997; 71 (3):2292-302.
- Anjuere F, Czerkinsky C. [Mucosal immunity and vaccine development]. *Med Sci (Paris)* 2007; 23 (4):371-8.
- Atanasiu P, ORTH G, Dragonas P. [Delayed specific antitumoral resistance in the hamster immunized shortly after birth with the polyoma virus]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1962; 254:2250-2.
- Aubry S, Charron J. N-Myc shares cellular functions with c-Myc. *DNA Cell Biol* 2000; 19 (6):353-64.
- Baudino TA, Cleveland JL. The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 2001; 21 (3):691-702.
- Beekman NJ, van Veelen PA, van HT, *et al.* Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J Immunol* 2000; 164 (4):1898-905.
- Bell E, Lunec J, Tweddle DA. Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. *Cell Cycle* 2007; 6 (10):1249-56.
- Bell E, Premkumar R, Carr J, *et al.* The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. *Cell Cycle* 2006; 5 (22):2639-47.
- Bell E, Chen L, Liu T, *et al.* MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Letters* 2010; 293 (2):144-57.
- Berens C, Hillen W. Gene regulation by tetracyclines. *Genet Eng (N Y)* 2004; 26:255-77.
- Berger E, Soldati R, Huebener N, *et al.* Salmonella SL7207 application is the most effective DNA vaccine delivery method for successful tumor eradication in a murine model for neuroblastoma. *Cancer Lett* 2013.
- Berthold F, Burdach S, Kremens B, *et al.* The role of chemotherapy in the treatment of children with neuroblastoma stage IV: the GPO (German Pediatric Oncology Society) experience. *Klin Padiatr* 1990; 202 (4):262-9.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7 (6):1513-23.
- Boes B, Hengel H, Ruppert T, *et al.* Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 1994; 179 (3):901-9.
- Bolhassani A, Safaiyan S, Rafati S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. *Mol Cancer* 2011; 10:3.

- Boon K, Caron HN, van AR, *et al.* N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 2001; 20 (6):1383-93.
- Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, *et al.* Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer* 1986; 58 (2 Suppl):541-5.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224 (4653):1121-4.
- Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM. Translating tumor antigens into cancer vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18 (1):23-34.
- Burcin MM, O'Malley BW, Tsai SY. A regulatory system for target gene expression. *Front Biosci* 1998; 3:c1-c7.
- Burgin A, Bouchard C, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ* 1998; 22:181-97.
- Burrows GG, Ariail K, Celnik B, *et al.* Variation in H-2K(k) peptide motif revealed by sequencing naturally processed peptides from T-cell hybridoma class I molecules. *J Neurosci Res* 1996; 45 (6):803-11.
- Catic A, Dietrich G, Gentschev I, *et al.* Introduction of protein or DNA delivered via recombinant *Salmonella typhimurium* into the major histocompatibility complex class I presentation pathway of macrophages. *Microbes Infect* 1999; 1 (2):113-21.
- Chen L, Iraci N, Gherardi S, *et al.* p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Res* 2010; 70 (4):1377-88.
- Chen Z, Lin Y, Barbieri E, *et al.* Mdm2 deficiency suppresses MYCN-Driven neuroblastoma tumorigenesis in vivo. *Neoplasia* 2009; 11 (8):753-62.
- Cheng AJ, Cheng NC, Ford J, *et al.* Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 2007; 43 (9):1467-75.
- Chesler L, Goldenberg DD, Collins R, *et al.* Chemotherapy-induced apoptosis in a transgenic model of neuroblastoma proceeds through p53 induction. *Neoplasia* 2008; 10 (11):1268-74.
- Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models – Contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Seminars in Cancer Biology* 2011; 21 (4):245-55.
- Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991; 352 (6330):67-70.
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009; 27 (2):289-97.
- Croce M, Meazza R, Orengo AM, *et al.* Immunotherapy of neuroblastoma by an Interleukin-21-secreting cell vaccine involves survivin as antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57 (11):1625-34.
- Croce M, Meazza R, Orengo AM, *et al.* Sequential immunogene therapy with interleukin-12- and interleukin-15-engineered neuroblastoma cells cures metastatic disease in syngeneic mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11 (2 Pt 1):735-42.
- Croce M, Orengo AM, Azzarone B, Ferrini S. Immunotherapeutic applications of IL-15. *Immunotherapy* 2012; 4 (9):957-69.
- Curtsinger JM, Gerner MY, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. *J Immunol* 2007; 178 (11):6752-60.
- Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999; 162 (6):3256-62.
- Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 2005; 174 (8):4465-9.
- Darji A, Guzman CA, Gerstel B, *et al.* Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997; 91 (6):765-75.
- Darji A, Zur LS, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27 (4):341-9.
- Dietrich G, Gentschev I, Hess J, *et al.* Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. *Immunol Today* 1999; 20 (6):251-3.

- Dietrich G, Spreng S, Favre D, Viret JF, Guzman CA. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5 (1):10-9.
- Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, *et al.* Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med* 1995; 1 (6):583-7.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Immunization with DNA. *J Immunol Methods* 1994; 176 (2):145-52.
- Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 2005; 175 (2):633-9.
- Ecker DJ, Butt TR, Marsh J, *et al.* Ubiquitin function studied by disulfide engineering. *J Biol Chem* 1989; 264 (3):1887-93.
- Ehl S, Hombach J, Aichele P, *et al.* Viral and bacterial infections interfere with peripheral tolerance induction and activate CD8+ T cells to cause immunopathology. *J Exp Med* 1998; 187 (5):763-74.
- Eilers M. Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells* 1999; 9 (1):1-6.
- Eischen CM, Lozano G. p53 and MDM2: antagonists or partners in crime? *Cancer Cell* 2009; 15 (3):161-2.
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 1999; 13 (20):2658-69.
- Eschenburg G, Stermann A, Preissner R, Meyer HA, Lode HN. DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010:169484.
- Feltquate DM. DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31:304-11.
- Fest S, Huebener N, Bleeke M, *et al.* Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma. *Int J Cancer* 2009; 125 (1):104-14.
- Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:174378.
- Fong CT, White PS, Peterson K, *et al.* Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1992; 52 (7):1780-5.
- Forloni M, Albini S, Limongi MZ, *et al.* NF-kappaB, and not MYCN, regulates MHC class I and endoplasmic reticulum aminopeptidases in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2010; 70 (3):916-24.
- Frentzel S, Pesold-Hurt B, Seelig A, Kloetzel PM. 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* 1994; 236 (4):975-81.
- Fruci D, Lauvau G, Saveanu L, *et al.* Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J Immunol* 2003; 170 (6):2977-84.
- Fukumi S, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Ohno T, Yamada H. Concentration-dependent variable effects of etoposide on the cell cycle of CML cells. *Anticancer Res* 2000; 20 (5A):3105-10.
- Fulda S, Lutz W, Schwab M, Debatin KM. MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-triggered apoptosis. *Med Pediatr Oncol* 2000; 35 (6):582-4.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, *et al.* DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (24):11478-82.
- Gardlik R, Fruehauf JH. Bacterial vectors and delivery systems in cancer therapy. *IDrugs* 2010; 13 (10):701-6.
- Garson JA, McIntyre PG, Kemshead JT. N-myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* 1985; 2 (8457):718-9.
- Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, *et al.* Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002; 291 (6-7):577-82.
- Gil M, Bieniasz M, Wierzbicki A, *et al.* Targeting a Mimotope Vaccine to Activating FcγR Receptors Empowers Dendritic Cells to Prime Specific CD8+ T Cell Responses in Tumor-Bearing Mice. *The Journal of Immunology* 2009; 183 (10):6808-18.
- Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH, Rohrwild M. New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem* 1997; 378 (3-4):131-40.



- Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 2002; 39 (3-4):147-64.
- Gossen M, Bujard H. Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 2002; 36:153-73.
- Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 2004; 16 (5):323-33.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36 (1):59-74.
- Grant EP, Michalek MT, Goldberg AL, Rock KL. Rate of antigen degradation by the ubiquitin-proteasome pathway influences MHC class I presentation. *J Immunol* 1995; 155 (8):3750-8.
- Groux H. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2001; 3 (11):883-9.
- Gry M, Rimini R, Stromberg S, *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* 2009; 10 (1):365.
- Gu L, Zhang H, He J, *et al.* MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 2012; 31 (11):1342-53.
- Gustafson WC, Weiss WA. Myc proteins as therapeutic targets. *Oncogene* 2010; 29 (9):1249-59.
- Harding CV, Unanue ER. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 1990; 346 (6284):574-6.
- Hardwick N, Chain B. Epitope spreading contributes to effective immunotherapy in metastatic melanoma patients. *Immunotherapy* 2011; 3 (6):731-3.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425-79.
- Himoudi N, Yan M, Papanastasiou A, Anderson J. MYCN as a target for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57 (5):693-700.
- Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981; 291 (5812):238-9.
- Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005; 11 (4 Suppl):S45-S53.
- Holzhtutter HG, Frommel C, Kloetzel PM. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J Mol Biol* 1999; 286 (4):1251-65.
- Huebener N, Fest S, Hilt K, *et al.* Xenogeneic immunization with human tyrosine hydroxylase DNA vaccines suppresses growth of established neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* 2009a; 8 (8):2392-401.
- Huebener N, Fest S, Hilt K, *et al.* Xenogeneic immunization with human tyrosine hydroxylase DNA vaccines suppresses growth of established neuroblastoma. *Mol Cancer Ther* 2009b; 8 (8):2392-401.
- Huebener N, Fest S, Strandsby A, *et al.* A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity. *Mol Cancer Ther* 2008; 7 (7):2241-51.
- Huebener N, Lange B, Lemmel C, *et al.* Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; 197 (1-2):211-7.
- Hurlin PJ. N-Myc functions in transcription and development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75 (4):340-52.
- Hurlin PJ, Huang J. The MAX-interacting transcription factor network. *Semin Cancer Biol* 2006; 16 (4):265-74.
- Jackson DV, Jr., Bender RA. Cytotoxic thresholds of vincristine in a murine and a human leukemia cell line in vitro. *Cancer Res* 1979; 39 (11):4346-9.
- Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987; 165 (2):302-19.
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171 (12):6323-7.

- Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001; 22 (7):394-400.
- Kellenberger C, Roussel A, Malissen B. The H-2Kk MHC Peptide-Binding Groove Anchors the Backbone of an Octameric Antigenic Peptide in an Unprecedented Mode. *The Journal of Immunology* 2005; 175 (6):3819-25.
- Khanna R. Tumour surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol Cell Biol* 1998; 76 (1):20-6.
- Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121 (1):1-14.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999; 274 (6):3363-71.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, *et al.* Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93 (20):10933-8.
- Kraft R, Kostka S, Grelle G, *et al.* Influence of single amino acid exchanges in epitope generation by 20S proteasome. *J Protein Chem* 1998; 17 (6):547-8.
- Krieg AM. CpG oligonucleotides as immune adjuvants. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2000 (30):105-18.
- Krieg AM. Toll-free vaccines? *Nat Biotechnol* 2007; 25 (3):303-5.
- Kubitscheck U, Levi R, Horwitz RJ, Arnon R, Pecht I. Peptide binding to class I molecules of the major histocompatibility complex on the surface of living target cells. *Scand J Immunol* 1992; 36 (2):341-8.
- Lampson LA, George DL. Interferon-mediated induction of class I MHC products in human neuronal cell lines: analysis of HLA and beta 2-m RNA, and HLA-A and HLA-B proteins and polymorphic specificities. *J Interferon Res* 1986; 6 (3):257-65.
- Lauder I, Aherne W. The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. *Br J Cancer* 1972; 26 (4):321-30.
- Lee WH, Murphree AL, Benedict WF. Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 1984; 309 (5967):458-60.
- Lode HN, Handgretinger R, Schuermann U, *et al.* Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD2 immunocytochemistry. *Eur J Cancer* 1997a; 33 (12):2024-30.
- Lode HN, Huebener N, Zeng Y, *et al.* DNA minigene vaccination for adjuvant neuroblastoma therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028:113-21.
- Lode HN, Pertl U, Xiang R, Gaedicke G, Reisfeld RA. Tyrosine hydroxylase-based DNA-vaccination is effective against murine neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2000; 35 (6):641-6.
- Lode HN, Reisfeld RA. Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res* 2000; 21 (2-3):279-88.
- Lode HN, Xiang R, Varki NM, *et al.* Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1997b; 89 (21):1586-94.
- Lorenzi S, Forloni M, Cifaldi L, *et al.* IRF1 and NF- $\kappa$ B restore MHC class I-restricted tumor antigen processing and presentation to cytotoxic T cells in aggressive neuroblastoma. *PLoS One* 2012; 7 (10):e46928.
- Lutz W, Fulda S, Jeremias I, Debatin KM, Schwab M. MycN and IFN $\gamma$  cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* 1998; 17 (3):339-46.
- Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602 (1):61-71.
- Lutz W, Stohr M, Schurmann J, *et al.* Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 1996; 13 (4):803-12.
- Malynn BA, de Alboran IM, O'Hagan RC, *et al.* N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* 2000; 14 (11):1390-9.
- Malynn BA, Ma A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity* 2010; 33 (6):843-52.

- Marathe SA, Lahiri A, Negi VD, Chakravorty D. Typhoid fever & vaccine development: a partially answered question. *Indian J Med Res* 2012; 135:161-9.
- Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 2005; 17 (1):7-13.
- Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 362 (23):2202-11.
- Martinez AN, Tenzer S, Schild H. T-cell epitope processing (the epitope flanking regions matter). *Methods Mol Biol* 2009; 524:407-15.
- Matzinger P. Why positive selection? 1993.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64:429-35.
- Mizuguchi H, Hayakawa T. Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1568 (1):21-9.
- Modak S, Cheung NK. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev* 2010; 36 (4):307-17.
- Molenaar JJ. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. 2012.
- Mollenkopf H, Dietrich G, Kaufmann SH. Intracellular bacteria as targets and carriers for vaccination. *Biol Chem* 2001; 382 (4):521-32.
- Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, *et al.* Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 1993; 12 (9):777-83.
- Moroz V, Machin D, Faldum A, *et al.* Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Eur J Cancer* 2011; 47 (4):561-71.
- Navid F, Armstrong M, Barfield RC. Immune therapies for neuroblastoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8 (10):874-82.
- Neal Z, Imboden M, Rakhmievich A, *et al.* NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2004; 53 (1):41-52.
- Neefjes JJ. Antigen presentation by MHC class I and II molecules. *Immunobiology* 1996; 195 (4-5):456-60.
- Neefjes JJ, Dierx J, Ploegh HL. The effect of anchor residue modifications on the stability of major histocompatibility complex class I-peptide interactions. *Eur J Immunol* 1993; 23 (4):840-5.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18 (19):3004-16.
- Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (2):148-58.
- Niethammer AG, Xiang R, Ruehlmann JM, *et al.* Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma. *Cancer Res* 2001; 61 (16):6178-84.
- Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, *et al.* TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol* 2002; 22 (14):5054-63.
- Nisen PD, Waber PG, Rich MA, *et al.* N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80 (20):1633-7.
- Nisen PD, Zimmerman KA, Cotter SV, Gilbert F, Alt FW. Enhanced expression of the N-myc gene in Wilms' tumors. *Cancer Res* 1986; 46 (12 Pt 1):6217-22.
- Norda M, Falk K, Rotzschke O, *et al.* Comparison of the H-2Kk- and H-2Kkm1-restricted peptide motifs. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14 (2):144-9.
- Nussbaum AK, Kuttler C, Tenzer S, Schild H. Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. *Curr Opin Immunol* 2003; 15 (1):69-74.
- Oberthuer A, Theissen J, Westermann F, Hero B, Fischer M. Molecular characterization and classification of neuroblastoma. *Future Oncol* 2009; 5 (5):625-39.

- Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, *et al.* Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (5):2233-8.
- Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970; 65 (1):129-36.
- Ossendorp F, Eggers M, Neisig A, *et al.* A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity* 1996; 5 (2):115-24.
- Otto T, Horn S, Brockmann M, *et al.* Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15 (1):67-78.
- Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, *et al.* BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem* 2004; 279 (19):19643-8.
- Patterson DM, Shohet JM, Kim ES. Preclinical models of pediatric solid tumors (neuroblastoma) and their use in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 2011; Chapter 14:Unit.
- Patyar S, Joshi R, Byrav DS, *et al.* Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci* 2010; 17 (1):21.
- Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol* 2003; 4 (9):548-56.
- Pertl U, Luster AD, Varki NM, *et al.* IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J Immunol* 2001; 166 (11):6944-51.
- Pochampally R, Fodera B, Chen L, Lu W, Chen J. Activation of an MDM2-specific caspase by p53 in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274 (21):15271-7.
- Pochampally R, Fodera B, Chen L, *et al.* A 60 kd MDM2 isoform is produced by caspase cleavage in non-apoptotic tumor cells. *Oncogene* 1998; 17 (20):2629-36.
- Postle K, Nguyen TT, Bertrand KP. Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Research* 1984; 12 (12):4849-63.
- Powrie F, Maloy KJ. Immunology. Regulating the regulators. *Science* 2003; 299 (5609):1030-1.
- Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003; 18 (3):343-54.
- Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van Den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005; 6 (3):280-6.
- Prud'homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 2005; 7 (1):3-17.
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bacher OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999; 50 (3-4):213-9.
- Rennel E, Gerwins P. How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem* 2002; 309 (1):79-84.
- Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1 (6):362-8.
- Rottmann S, Luscher B. The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 302:63-122.
- Rotzschke O. Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway. 1991.
- Ryan KM, Birnie GD. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* 1996; 314 ( Pt 3):713-21.
- Sandberg JK, Franksson L, Sundback J, *et al.* T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity. *J Immunol* 2000; 165 (1):25-33.
- Sarkar AK, Nuchtern JG. Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2000; 60 (7):1908-13.
- Sasai K, Parant JM, Brandt ME, *et al.* Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. *Oncogene* 2008; 27 (29):4122-7.

- Schmitt FC, Longatto-Filho A, Valent A, Vielh P. Molecular techniques in cytopathology practice. *Journal of Clinical Pathology* 2008; 61 (3):258-67.
- Schwab M. MYCN Amplification in Neuroblastoma: a Paradigm for the Clinical Use of an Oncogene. *Pathol Oncol Res* 1997; 3 (1):3-7.
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, *et al.* Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; 305 (5931):245-8.
- Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4 (8):472-80.
- Schwartz RH. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6 (4):327-30.
- Schwarz K, Eggers M, Soza A, *et al.* The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur J Immunol* 2000; 30 (12):3672-9.
- Seeger RC. Immunology and immunotherapy of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011; 21 (4):229-37.
- Sherman LA. Alloantibodies can discriminate class I major histocompatibility complex molecules associated with various endogenous peptides. 1993.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13 (12):1501-12.
- Sijts A, Sun Y, Janek K, *et al.* The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol* 2002; 39 (3-4):165-9.
- Sijts EJ, Kloetzel PM. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68 (9):1491-502.
- Simon T, Hero B, Faldum A, *et al.* Long term outcome of high-risk neuroblastoma patients after immunotherapy with antibody ch14.18 or oral metronomic chemotherapy. *BMC Cancer* 2011; 11:21.
- Simon T, Hero B, Faldum A, *et al.* Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22 (17):3549-57.
- Slack A, Chen Z, Tonelli R, *et al.* The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102 (3):731-6.
- Slack A, Shohet JM. MDM2 as a critical effector of the MYCN oncogene in tumorigenesis. *Cell Cycle* 2005; 4 (7):857-60.
- Soto BL, Hank JA, Darjatmoko SR, *et al.* Anti-tumor and immunomodulatory activity of resveratrol in vitro and its potential for combining with cancer immunotherapy. *International Immunopharmacology* 2011; 11 (11):1877-86.
- Spierings DC, Agsteribbe E, Wilschut J, Huckriede A. Characterization of antigen-presenting properties of tumour cells using virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer* 2000; 82 (8):1474-9.
- Stallings RL, Yoon K, Kwek S, Ko D. The origin of chromosome imbalances in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 176 (1):28-34.
- Stieger K, Belbellaa B, Le GC, Moullier P, Rolling F. In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61 (7-8):527-41.
- Stockinger B. T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms. *Adv Immunol* 1999; 71:229-65.
- Strieder V, Lutz W. Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer Lett* 2002; 180 (2):107-19.
- Sykulev Y, Joo M, Vturina I, Tsomides TJ, Eisen HN. Evidence that a Single Peptide-MHC Complex on a Target Cell Can Elicit a Cytolytic T Cell Response. *Immunity* 1996; 4 (6):565-71.
- Teitz T, Stanke JJ, Federico S, *et al.* Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One* 2011; 6 (4):e19133.
- Thomson SA, Sherri MA, Medveczky J, *et al.* Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol* 1998; 160 (4):1717-23.

- Trastoy MO, Defais M, Larminat F. Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis* 2005; 20 (2):111-4.
- Tuting T, Austyn J, Storkus WJ, Falo LD, Jr. The immunology of DNA vaccines. *Methods Mol Med* 2000; 29:37-64.
- Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, *et al.* The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; 197 (1-2):93-8.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259 (5102):1745-9.
- van 't Veer LJ, Beijersbergen RL, Bernards R. N-myc suppresses major histocompatibility complex class I gene expression through down-regulation of the p50 subunit of NF-kappa B. *EMBO J* 1993; 12 (1):195-200.
- van Endert PM, Riganelli D, Greco G, *et al.* The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 1995; 182 (6):1883-95.
- van Noesel MM, Pieters R, Voute PA, Versteeg R. The N-myc paradox: N-myc overexpression in neuroblastomas is associated with sensitivity as well as resistance to apoptosis. *Cancer Lett* 2003; 197 (1-2):165-72.
- Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, *et al.* Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol* 2001; 166 (9):5366-73.
- Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 1997; 16 (11):2985-95.
- Westermann F, Muth D, Benner A, *et al.* Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biol* 2008; 9 (10):R150.
- Westermarck UK, Wilhelm M, Frenzel A, Henriksson MA. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011; 21 (4):256-66.
- White PS, Thompson PM, Seifried BA, *et al.* Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36 (1):37-41.
- Whitton JL. Induction of protective immunity using minigenes. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 730:107-17.
- Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 1997; 11 (14):1245-56.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247 (4949 Pt 1):1465-8.
- Wong AJ, Ruppert JM, Eggleston J, *et al.* Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 1986; 233 (4762):461-4.
- Xiang R, Luo Y, Niethammer AG, Reisfeld RA. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol Rev* 2008; 222:117-28.
- Yamada S. [Expression of c-myc and N-myc in mouse embryos during craniofacial development]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 1990; 57 (1):83-105.
- York IA, Goldberg AL, Mo XY, Rock KL. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 1999; 172:49-66.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, *et al.* Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 363 (14):1324-34.
- Zehn D. T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. 2006.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2002; 13 (2):121-8.
- Zimmerman KA, Yancopoulos GD, Collum RG, *et al.* Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* 1986; 319 (6056):780-3.

## Anhang

### Publikationen

Paper geordnet nach Erscheinungsjahr:

**Salmonella SL7207 application is the most effective DNA vaccine delivery method for successful tumor eradication in a murine model for neuroblastoma.**

Berger,E.; Soldati,R.; Huebener,N.; Hohn,O.; **Stermann,A.**; Durmus,T.; Lobitz,S.; Zenclussen,A.C.; Christiansen,H.; Lode,H.N.; Fest,S. Cancer Lett 2013.

**Fenretinide sensitizes multidrug-resistant human neuroblastoma cells to antibody-independent and ch14.18-mediated NK cell cytotoxicity.**

Shibina,A.; Seidel,D.; Somanchi,S.S.; Lee,D.A.; **Stermann,A.**; Maurer,B.J.; Lode,H.N.; Reynolds,C.P.; Huebener,N. J Mol Med 2012.

**DNA vaccination: using the patient's immune system to overcome cancer.**

Eschenburg,G.; **Stermann,A.**; Preissner,R.; Meyer,H.A.; Lode,H.N. Clin Dev Immunol 2010; 2010:169484.

**Xenogeneic immunization with human tyrosine hydroxylase DNA vaccines suppresses growth of established neuroblastoma.**

Huebener,N.; Fest,S.; Hilt,K.; Schramm,A.; Eggert,A.; Durmus,T.; Woehler,A.; **Stermann,A.**; Bleeke,M.; Baykan,B.; Weixler,S.; Gaedicke,G.; Lode,H.N. Mol Cancer Ther 2009; 8 (8):2392-401.

**Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma.**

Fest,S.; Huebener,N.; Bleeke,M.; Durmus,T.; **Stermann,A.**; Woehler,A.; Baykan,B.; Zenclussen,A.C.; Michalsky,E.; Jaeger,I.S.; Preissner,R.; Hohn,O.; Weixler,S.; Gaedicke,G.; Lode,H.N. Int J Cancer 2009; 125 (1):104-14.

### **Vorträge**

2007 XX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Deutschland

2008 XXI. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Deutschland

67. Tagung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) in Wien, Österreich

2009 3th Rostock Symposion for Tumor Immunology in Pediatrics 2009, Rostock, Deutschland

2010 4th Rostock Symposion for Tumor Immunology in Pediatrics 2010, Rostock, Deutschland

2012 Advances in Neuroblastoma Research (ANR), Toronto, Kanada

6th Rostock Symposion for Tumor Immunology in Pediatrics 2012, Rostock, Deutschland

## Posterpräsentationen

2008 Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2008, Chiba, Japan

Annual Meeting American Association Cancer Research (AACR) 2008, San Diego, USA

1<sup>st</sup> Annual Meeting of the Program of Medical Genome Research (NGFN) Meeting 2008, München, Deutschland

40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) 2008, Berlin, Deutschland

2009 8th Annual Meeting of the Program of Medical Genome Research (NGFN) Meeting Berlin, Deutschland

2010 Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2010, Stockholm, Schweden

101<sup>st</sup> Annual Meeting American Association Cancer Research (AACR) 2010, Washington, USA

2011 4th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research, Berlin, Deutschland

2012 4th International Tübingen-Symposium on Pediatric Solid Tumors, Tübingen, Deutschland

3rd International Conference on Immunotherapy in Pediatric Oncology, Frankfurt, Deutschland

Berlin, den

---

Alexander Stermann



**Versicherung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst zu haben und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche gekennzeichnet zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Berlin, den

---

Alexander Stermann